



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Biología



Coordinación de Estudios de Posgrado

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

TESIS

**Filogeografía de tres especies de Goodeidos endémicos del
Centro de México: *Allotoca catarinae*, *A. diazi* y *A. meeki*
(Cyprinodontiformes: Goodeidae).**

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

(Ecología y Conservación)

Presenta:

Biol. Diushi Keri Corona Santiago

TUTOR: Dr. Omar Domínguez Domínguez

CO-TUTOR: Dr. Ignacio Doadrio Villarejo

Morelia, Michoacán, Agosto del 2013

Índice

I. Resumen.....	6
II. Summary	7
III. Introducción.....	8
IV. Antecedentes.....	11
4.1 Sistemática y Taxonomía de la Subfamilia Goodeinae	11
4.2 Características Biológicas de la Subfamilia Goodeinae	12
4.3 El Género Allotoca.....	13
4.4 El Complejo Allotoca diazi	15
4.4.1 <i>Allotoca diazi</i> (Meek, 1902). Chorumo.....	16
4.4.2 <i>Allotoca meeki</i> (Álvarez, 1959). Tiro de Zirahuén.....	17
4.4.3 <i>Allotoca catarinae</i> (De Buen, 1942). Tiro Catarina.....	18
4.5 Hipótesis Biogeográficas	20
4.6 Evidencias de conexiones entre lagos de Cuitzeo, Zacapu, Pátzcuaro y Zirahuén.....	22
<i>Conexión Cuitzeo-Zacapu</i>	22
<i>Conexión Zacapu-Pátzcuaro</i>	23
<i>Conexión Pátzcuaro-Zirahuén</i>	24
4.7 La Subcuenca del Río Cupatitzio.....	25
4.8 Trabajos Previos de Genética de la Ictiofauna Dentro de la Región	27
4.9 Filogeografía y Marcadores Moleculares	29
<i>Citocromo b (Cytb)</i>	29
<i>Microsatélites</i>	30
V. Justificación	32
VI. Hipótesis.....	33
VII. Objetivo General	33
VIII. Objetivos Particulares.....	33
IX. Materiales y Métodos.....	34
9.1 Muestreo	34
9.1.1 <i>Obtención de Secuencias</i>	36
9.1.2 <i>Obtención de Genotipos</i>	36
9.2 Análisis de Datos.....	38
9.2.1 <i>Cytb</i>	38
<i>Diferencia entre Secuencias e Inferencia Filogenética</i>	38
<i>Estructura genética</i>	39
<i>Demografía Histórica y Tiempos de Divergencia</i>	40
9.2.2 <i>Microsatélites</i>	43
<i>Diversidad Genética y Dinámica Poblacional</i>	43
<i>Estructura Genética</i>	44
<i>Tamaño Efectivo Poblacional y Tiempos de Divergencia</i>	47
9.2.3 <i>Predicciones de Nicho Ecológico en el Pasado</i>	48
9.2.4 <i>Predicciones de Nicho Ecológico en el Futuro e Identificación de Unidades de Conservación</i>	52
X. Resultados	55
10.1 Muestreo	55
10.1.2 <i>Secuenciación y Alineamiento Cytb</i>	55
10.1.3 <i>Obtención de Microsatélites</i>	55
10.2 Análisis.....	57
10.2.1 <i>Cytb</i>	57

<i>Diferencia entre Secuencias e Inferencia Filogenética</i>	57
<i>Estructura Genética</i>	58
<i>Demografía Histórica y Tiempos de Divergencia</i>	59
10.2.2 Microsatélites	67
<i>Diversidad Genética y Dinámica Poblacional</i>	67
<i>Estructura Genética</i>	69
<i>Demografía Histórica y Tiempos de Divergencia</i>	73
10.2.3 Predicciones de Nicho Ecológico en el Pasado	76
<i>Periodo Interglacial ~120-140,000 Años</i>	76
<i>Periodo del Último Máximo Glaciar ~21 Años</i>	77
<i>Periodo entre los años 1950 y 2000</i>	78
10.2.2 Predicciones de Nicho Ecológico en el Futuro e Identificación de Unidades de Conservación	81
<i>Periodo entre los años 2020, 2050 y 2080</i>	81
XI. Discusión	84
11.1 Filogeografía e Historia Evolutiva de <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	84
11.2 Biogeografía y Demografía Histórica de <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> ...	89
11.3 Implicaciones Taxonómicas	98
11.4 Implicaciones de Conservación.....	100
XII. Conclusiones	104
XIII. Datos Complementarios	107
XIV. Bibliografía Citada	110

Índice de Figuras.

Figura 1. Distribución geográfica de la subfamilia Goodeinae y del género <i>Allotoca</i>	14
Figura 2. Distribución geográfica de las especies <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	15
Figura 3. Macho de <i>Allotoca diazi</i> . ©Domínguez-Domínguez Omar.	17
Figura 4. Hembra adulta de <i>Allotoca meeki</i> . ©Domínguez-Domínguez Omar.	18
Figura 5. Macho y Hembra adultos de <i>Allotoca catarinae</i>	20
Figura 6. Hipótesis Biogeográfica: De Buen (1943).....	21
Figura 7. Hipótesis biogeográfica: Álvarez (1972).....	22
Figura 8. Localización de los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén y principales estructuras volcánicas a su alrededor.....	25
Figura 9. Localización de la Depresión del río Balsas en la República Mexicana.	26
Figura 10. Localidades de colecta para las tres especies. N = tamaño de muestra por localidad.	35
Figura 11. Topologías posibles para la estima de tiempos de divergencia, cambios en el tamaño efectivo poblacional y tasa de migración a través de Coalescencia.....	42
Figura 12. Inferencia Filogenética de las especies <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> con el gen mitocondrial <i>Cytb</i>	58
Figura 13. Red de Haplotipos para <i>Allotoca diazi</i> (n=35), <i>A. meeki</i> (n=22) y <i>A. catarinae</i> (n=52).....	60
Figura 14. Cambio en el tamaño efectivo poblacional para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través del método BSP.....	62
Figura 15. Modelo Coalescente de <i>Cytb</i> para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través de BSP.....	63
Figura 16. Distribución de las probabilidades en el análisis de tiempos de divergencia, tasa de migración y tamaño efectivo poblacional histórico a través de IMA2 con el gen <i>Cytb</i> para diferentes escenarios de ancestría-descendencia entre <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	66
Figura 17. Número de grupos (K) que mejor explican la estructura genética entre <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> por el criterio ΔK (Evanno <i>et al.</i> 2005) y de Información de la Desviación-DIC (Spielgelhalter <i>et al.</i> 2002).	71
Figura 18. Estructura genética a través de Inferencia Bayesiana para (1) <i>Allotoca diazi</i> , (2) <i>A. meeki</i> y (3) <i>A. catarinae</i>	72

Figura 19. Proporción de individuos asignados de <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a cada grupo estimado (K=2) a través de Structure v2.3.3.....	72
Figura 20. Distribución de las probabilidades en el análisis de tiempos de divergencia (Izquierda), tasa de migración (Centro) y tamaño efectivo poblacional histórico (Derecha) a través de IMA2 con 7 loci de microsatélites para diferentes escenarios de ancestría-descendencia entre <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	75
Figura 21. Modelos de predicción de nicho ecológico en el pasado para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través de máxima entropía: Periodo interglaciar (~120,000-140,000 años) y periodo del último máximo glacial (~21,000 Años) y desde el año 1950-2000.....	79
Figura 22. Modelos de predicción de nicho ecológico en el pasado para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través de máxima entropía: Desde el año 1950-2000	80
Figura 23. Modelos de predicción de nicho ecológico en el futuro para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través de máxima entropía: Año 2020, 2050 y 2080.....	83
Figura 24. Nivel del lago de Pátzcuaro en el año 1521 y 1850.....	92
Figura 25. Variación de la diversidad genética tras un efecto fundador y pérdida de la variación genética como consecuencia de las alteraciones del hábitat	97

Índice de Tablas.

Tabla 1. Número de organismos colectados para cada especie en su rango de distribución.....	35
Tabla 2. Modelos Evolutivos de Sustitución y Parámetros estimados para <i>Cytb</i> por el Criterio de Información AIC (Criterio de Información de Akaike).	39
Tabla 3. Variables Climáticas utilizadas para el modelo de Nicho Ecológico en el Pasado.....	51
Tabla 4. Caracterización de 20 loci de Microsatélites en <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> . T_a =Temperatura de alineamiento. ND=No designado como alelo por posible inespecificidad.....	56
Tabla 5. Distancias genéticas pareadas absolutas D_p no corregidas (Bajo Diagonal) y su error estándar (Sobre la Diagonal) a partir de <i>Cytb</i> para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	57
Tabla 6. Estructura genética a través de análisis de varianza molecular (AMOVA) para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	59
Tabla 7. Diferenciación genética estimada para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	59
Tabla 8. Diversidad genética de <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> y Prueba de Neutralidad.....	60
Tabla 9. Rangos de tiempos de divergencia, tasa de migración y tamaño efectivo poblacional de <i>A. diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través de IMA2 para el gen <i>Cytb</i> (HPD \geq 95%).	65
Tabla 10. Diversidad Alélica en 7 loci de Microsatélites por locus y por especie (<i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>).....	68
Tabla 11. Diversidad genética, equilibrio de Hardy Weinberg y cuellos de botella para 7 loci de microsatélites en <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i>	69
Tabla 12. Nivel de estructura genética a través del análisis de varianza molecular (AMOVA) para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> con 7 loci de microsatélites.	70
Tabla 13. Diferenciación genética F_{st} estimada para <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> con 7 loci de microsatélites.	70
Tabla 14. Nivel de Estructura Genética a través de R_{st} entre <i>Allotoca diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> con análisis de permutaciones.	73
Tabla 15. Rangos de tiempos de divergencia, tasa de migración y tamaño efectivo poblacional de <i>A. diazi</i> , <i>A. meeki</i> y <i>A. catarinae</i> a través de IMA2 para el gen <i>Cytb</i> (HPD \geq 95%).	74

I. Resumen

Allotoca diazi, *A. meeki* y *A. catarinae* son representantes de la familia Goodeidae, un grupo de peces endémicos del Centro de México. Cada una de las tres especies se encuentran aisladas en cuerpos de agua independientes: el Lago de Pátzcuaro, el lago de Zirahuén y la subcuenca del río Cupatitzio respectivamente. De acuerdo a la situación particular del rango de distribución, se esperaría una estructura genética bien diferenciada entre si. Sin embargo estas especies se encuentran estrechamente relacionadas genética y morfológicamente y por consecuencia, son un grupo con alta complejidad taxonómica y biogeográfica. El objetivo de este estudio es determinar la historia evolutiva de las tres especies bajo la hipótesis de que su actual distribución está estrechamente vinculada a la historia geológica de la región. Se utilizaron marcadores moleculares con tasas de mutación variables (Citocromo *b* y Microsatélites) que han demostrado su capacidad de resolución intraespecífico y a nivel de individuo, respectivamente. Se obtuvieron 109 secuencias del gen mitocondrial Citocromo *b* (Cytb 1140pb) y 96 genotipos de 7 loci de microsatélites en las tres especies. Se implementaron análisis para la reconstrucción filogenética, filogeografica, nivel de estructura genética, de demografía histórica de las especies y modelos de predicción de nicho ecológico hacia el pasado y futuro. En base al Cytb, las distancias genéticas (0.3-0.6%) son menores que las reportadas entre especies hermanas de la familia (1.7-11%). Todas las poblaciones de *A. catarinae* tienen un único haplotipo en 52 individuos, indicativo de un efecto fundador o un cuello de botella recurrente. Esta especie no comparte ningún haplotipo con las otras dos. El otro haplogrupo está conformado por *A. diazi* y *A. meeki* y no se resuelve como monofilia recíproca, donde *A. diazi* es la más diversa con 5 haplotipos en 35 individuos y comparte dos haplotipos con *A. meeki*. Esta última sólo tiene 3 haplotipos en 22 individuos analizados. Los microsatélites mostraron un nivel de estructuración genética bajo pero significativo entre las especies ($F_{st}=0.113$). La diferenciación genética más alta se encontró entre *A. catarinae* respecto de *A. diazi* y *A. meeki* ($F_{st}=133$ y $F_{st}=109$, respectivamente). A través de Inferencia Bayesiana se observo un nivel de estructura genética no clara en la que no se identifican grupos genéticos bien definidos. La hipótesis de hibridación fue descartada ya que no se encontró tasa de migración significativa, y diversidad genética y distancias genéticas no fueron lo suficientemente altas dentro del complejo. Por lo tanto, *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* comprenden un complejo de especies incipientes que se han separado pero que aún no pasa el tiempo suficiente para que diverjan genéticamente. El tiempo de divergencia del complejo respecto a su grupo hermano *A. zacapuensis* fue de 1 millón de años, congruente con los eventos de separación de Zacapu y el lago de Pátzcuaro. El tiempo de separación estimado para *A. diazi* y *A. meeki* está dentro de los últimos 7,000 congruente con los eventos geológicos que posiblemente separaron al lago de Pátzcuaro y Zirahuén: La formación y colapso del volcán el Estribo (en los últimos ~30,000 años) y la formación del volcán La Taza (~8,000 años). Dicha conexión también es soportada con la ictiofauna que se comparte entre ambos lagos y trabajos con genéticos previos con otras especies. Sin embargo, el tiempo de separación de *A. catarinae* se estimo para los últimos 8,000 años siendo con mayor probabilidad hace 1,800 años y no es congruente con ningún evento geológico y climático, ni tampoco existe congruencia ictiofaunística. La diversidad genética y el nivel de diferenciación dentro del complejo *A. diazi* está asociado a cambios demográficos históricos. Se identificaron cuellos de botella para cada una de las especies soportados por los desvíos significativos del equilibrio de Hardy-Weinberg por pérdida de heterocigosis con altos niveles de endogamia (>0.14 ; $P<0.05$). El descenso en el tamaño efectivo poblacional histórico de *A. diazi* tras la separación de *A. meeki* está influenciado al cambio climático y la actividad humana. Mientras que los eventos que separaron a *A. meeki* afectaron a dicha especie en menor intensidad. Los tiempos de separación de *A. catarinae* son congruentes con los asentamientos humanos de la región durante los últimos 2,300 años por lo que es indicativo de que *A. catarinae* es producto de un evento de efecto fundador mediado por el hombre. El cuello de botella identificado está asociado al efecto fundador y pudo contribuir a la rápida fijación de un haplotipo mitocondrial ancestral o que pertenece a las poblaciones posiblemente extirpadas de Pátzcuaro y Zirahuén. Dado que *A. diazi* y *A. meeki* no han divergido genéticamente y su separación ha sido por procesos naturales, se sugiere que se les considere como subespecies de *A. diazi* (*A. diazi diazi* y *A. diazi meeki*), con una población introducida en la subcuenca del río Cupatitzio. En suma, se identificaron sólo dos Unidades Operacionales de Conservación que deben tener importante atención puesto que no se les considera Áreas Naturales Protegidas y no existen programas para su conservación. Se observó que *A. diazi* es vulnerable a las fluctuaciones climáticas y en el futuro se podría ver afectada puesto que posiblemente existe una reducción de sus áreas potenciales. Se debe evaluar el efecto de la translocación de *A. diazi* en el río Cupatitzio.

II. Summary

Allotoca diazi, *A. meeki* and *A. catarinae* are Goodeidae family representatives, a group of fish endemic to central Mexico. Each of the three species are isolated in separate water bodies: Lake Patzcuaro, Lake Zirahuén and Cupatitzio subwatershed respectively. According to the situation of the distribution range, we would expect a genetic structure distinct from each other. However, these species are closely related genetically and morphologically and consequently, they are a group with high taxonomic and biogeographic complexity. The aim of this study is to determine the evolutionary history of the three species under the assumption that the current distribution is closely linked to the geological history of the region. Molecular markers were used with variable mutation rates (Cytochrome *b* and microsatellites) that have demonstrated their ability to solve intraspecific and individual level, respectively. 109 sequences were obtained mitochondrial Cytochrome *b* gene (Cytb 1140pb) and 96 genotypes of 7 microsatellite loci in three species. Were implemented for phylogenetic reconstruction, phylogeographic, level of genetic structure, historical demography analysis of species and prediction models of ecological niche in the past and future. Based on Cytb, genetic distances (0.3-0.6%) are lower than those reported among sister species of the family (1.7-11%). All populations of *A. catarinae* have one haplotype in 52 individuals, indicative of a founder effect or recurrent bottleneck. This species does not share any haplotype with the other two species. The other haplogroup is formed by *A. diazi* and *A. meeki* and not resolved as reciprocal monophyly, where *A. diazi* is the most diverse with five haplotypes in 35 individuals and shared two haplotypes with *A. meeki*. The latter only has 3 haplotypes in 22 individuals analyzed. The microsatellites showed a low level but significant genetic structure among species ($F_{st} = 0.113$). The highest genetic differentiation was found between *A. catarinae* respect to *A. diazi* and *A. meeki* ($F_{st}=133$ and $F_{st}=109$, respectively). Through Bayesian inference was observed unclear genetic structure which no well-defined genetic groups were identified. The hybridization hypothesis was discarded since no significant migration rate was found, and genetic diversity and genetic distances were not sufficiently high within the complex. Therefore, *A. diazi*, *A. meeki* and *A. catarinae* comprise an incipient species complex separated but with not enough time to diverge genetically. The divergence time of the complex with respect to its sister group *A. zacapuensis* was of 1 million years, consistent with the separation events Zacapu and Lake Patzcuaro. The separation time estimated to *A. diazi* and *A. meeki* is within the last 7,000 consistent with geological events possibly separated at Lake Patzcuaro and Zirahuén: The formation and collapse of volcano El Estribo (last ~30,000 years) and the formation of the volcano La Taza (~8,000 years). This connection is also supported with the fish fauna shared between the two lakes and with previous genetic work with other species. However, the separation time of *A. catarinae* was estimated for the last 8,000 years being more likely to 1.800 years ago and is not consistent with any geologic and climatic event, nor there is ictiofaunistic congruence. Genetic diversity and the level of differentiation within the complex *A. diazi* is associated with historical demographic changes. Bottlenecks effects were identified for each of the species supported by significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium for heterozygosity lack with high levels of inbreeding (> 0.14 , $P < .05$). The decrease in the effective population size history of *A. diazi* after separation of *A. meeki* is influenced by climate change and human activity. While the events that separated *A. meeki* affecting that species with less intensity. Separation times *A. catarinae* are consistent with human settlements in the region during the last 2.300 years so it is indicative that *A. catarinae* is a product of a founder effect event mediated by man. The bottleneck identified is associated with the founder effect and could contribute to the rapid fixation of a ancestral mitochondrial haplotype or belonging to possibly extirpated populations of Pátzcuaro and Zirahuén. Since *A. diazi* and *A. meeki* have not diverged genetically and their separation has been by natural processes, it is suggested to be considered as subspecies of *A. diazi* (*A. diazi diazi* and *A. diazi meeki*), with 4 introduced populations in Cupatitzio subwatershed. In sum, we identified only two Conservation Operational Units that should be important attention since they are not considered Protected Natural Areas and there are no programs for their conservation. Was observed that *A. diazi* is vulnerable to climatic fluctuations and could be affected in the future since there is possibly a reduction in potential areas. They should evaluate the effect of translocation of *A. Cupatitzio diazi* in the river.

III. Introducción

El centro de México (*sensu* Domínguez-Domínguez y Pérez-Ponce de León, 2009) cuenta con una extraordinaria diversidad íctica, sin embargo, su importancia no radica solamente en dicha diversidad, sino en la riqueza de endemismos que es resultado de la variada y accidentada fisiografía, derivada de la antigua e intensa actividad tectónica y volcánica de la zona. Aunado a lo anterior, otros factores como la posición geográfica de México y su historia climática y biogeográfica han influido en la conformación de la inusual diversidad íctica (Webb *et al.*, 2004). Esta región cuenta con aproximadamente 100 especies nativas de peces, el 70% de las cuales son endémicas (Miller *et al.* 2005). Dentro de los grupos de peces más representativos se encuentra la familia Goodeidae, la cual se divide en dos subfamilias; la Empetrichthyinae y Goodeinae, esta última endémica del centro de México.

La subfamilia Goodeinae tiene sus orígenes durante el Mioceno (Domínguez-Domínguez *et al.* 2006), tras la alta actividad tecto-volcánica en la Sierra Madre Occidental. Esta actividad está asociada a la apertura del Proto-Golfo de California (~12MA) (Aranda-Gómez *et al.* 2000) y a cambios climáticos que trajeron consigo la desertificación del noroeste de México y la formación del desierto de Sonora (~11.5MA) (Parenti, 1981; Philips y Wentworth, 2000).

Es por ello que los goodeinos han resultado ser un excelente modelo para probar hipótesis paleohidrológicas en dicha región de gran importancia biológica y económica. Los patrones de distribución de algunas especies de la subfamilia, que se encuentran aislados en cuencas hidrogáficas independientes, sugieren posibles conexiones entre las cuencas en el pasado.

Tres especies del género *Allotoca* (el más diverso de la subfamilia Goodeinae) están estrechamente relacionadas genética y morfológicamente, las cuales se encuentran dentro de una fuerte controversia taxonómica (De Buen, 1942; Álvarez, 1959; Webb *et al.* 2004; Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al.* 2012). La primera de ellas es *Allotoca diazi* (Meek, 1902), cuya distribución se restringe al lago de Pátzcuaro, la segunda es *A. meeki* (Álvarez, 1959), endémica de la cuenca de Zirahuén y que actualmente sólo se encuentra en el manantial de Opopeo y tributarios del mismo, por último *A. catarinae* (De Buen, 1942) restringida al río Cupatitzio

(Uruapan) en la cuenca del Río Balsas.

Para explicar el fenómeno de especiación en estas tres especies se han propuesto dos teorías que intentan explicar la conexión y asilamiento entre los distintos cuerpos de agua donde habitan. Por un lado se ha mencionado que el sistema del Bajo Lerma, Cuitzeo, Pátzcuaro y Zirahuén, se encontraban conectados en el pasado (De Buen, 1943). Por el otro, se menciona que existía un afluente que conectaba al río Cupatitzio con Zirahuén y Pátzcuaro, hasta llegar a Zacapu (Álvarez, 1972).

Por otro lado, las técnicas moleculares, en combinación con los métodos en biogeografía, genética y sistemática, han permitido estudiar la variación genética en la subfamilia, la variación entre las poblaciones, la dinámica poblacional, el origen de barreras reproductivas y demás procesos evolutivos.

A través de marcadores moleculares, se han cuestionado las conexiones recientes entre los lagos de Zirahuén, Pátzcuaro, Zacapu y Cuitzeo (Doadrio y Domínguez-Domínguez; 2004; Domínguez-Domínguez *et al.* 2008; Pérez-Rodríguez *et al.* 2009; Domínguez-Domínguez *et al.* 2010). Sin embargo se han reportado resultados contradictorios encontrado congruencias e incongruencias con las hipótesis de conexión y desconexión de estos cuerpos de agua propuestas por De Buen (1944) y Álvarez (1972).

Es por ello que en la presente investigación tiene por objeto describir la historia evolutiva de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través del uso técnicas moleculares. Para ello, se utilizan marcadores moleculares neutros del ADN mitocondrial (Gen Citocromo *b*-Cyt**b**) es decir, que la mayor parte de su variación es debida sólo a deriva genética, estos marcadores son considerados conservados, por lo que la información en relación a la historia evolutiva de la especie recae en un contexto histórico evolutivo. Con la finalidad de tener una mayor resolución histórica en las relaciones entre especies o poblaciones, se planteo la utilización de marcadores moleculares menos conservados, como son los marcadores nucleares de tipo microsatelite (Loci de Microsatélites) que se ha demostrado que tienen tanto resolución interespecífica como intraespecífica, aportando información en una escala de tiempo evolutivo mucho menor. De esta forma se puede obtener información histórico evolutiva en un rango de tiempo que varía en millones de años (Cyt-*b*) hasta la historia demográfica reciente de las especies o poblaciones en escalas que varían en

cientos o miles de años (loci microsatélites)

Mediante el uso de estos dos marcadores se pretende comprender los patrones de diversificación de este grupo de especies, su historia evolutiva, resolver las incertidumbres taxonómicas, así como la historia natural del lugar donde habitan. Aunado a lo anterior se podrían proponer criterios para la conservación desde una base genética.

IV. Antecedentes

4.1 Sistemática y Taxonomía de la Subfamilia Goodeinae

La subfamilia Goodeinae está conformada por 19 géneros y aproximadamente 41 especies (Domínguez-Domínguez *et al.* 2008). Alrededor de la mitad de las especies de goodeinos fueron descritas durante 1837 y 1904, siendo *Girardinichthys viviparus* (Bustamante, 1837) la primera especie descrita dentro de lo que hoy es la subfamilia Goodeinae. Seguidas por las descripciones que se dieron durante la segunda mitad del siglo XIX y comienzos del siglo XX (Bean, 1887 y 1892; Meek, 1902 y 1904; Jordan y Gilbert, 1882), momento en el cual las especies que conforman la subfamilia Goodeinae fueron incluidas dentro de los Cyprinodontidae (Garman, 1895; Regan, 1906-1908) y Poeciliidae (Jordan y Evermann, 1896; Meek, 1902, 1904). No fue hasta dos décadas más tarde en que se reconoció por primera vez a la subfamilia Goodeinae como un grupo natural (Carl Hubbs, 1924) y más tarde se realizó el primer estudio sistemático del grupo, enfatizando en las diferencias morfológicas con respecto a otros Ciprynodontiformes (Hubbs y Turner, 1939). Aún así, el género *Ilyodon*; actualmente un género perteneciente a la subfamilia Goodeinae, era incluida dentro de la familia Poeciliidae (Webb, 1998). Posteriormente, se realizó una revisión en la cual se concluyó que dada la alta variabilidad en las estructuras morfológicas, la información que aportaba la morfología no era suficiente para estudiar las relaciones filogenéticas (Miller y Fitzsimons, 1971). Aún así, estos últimos no propusieron una reclasificación del grupo.

Las sinonimias de los taxa previamente descritos era evidencia clara de que era posible la existencia de “nuevas” unidades taxonómicas (Weeb, 1998).

Por otro lado, se han hecho distintos trabajos para elucidar las relaciones y la sistemática dentro del grupo. Se ha considerado que la mayoría de las especies de la subfamilia dentro de los géneros *Characodon* y *Goodea*, basándose en caracteres osteológicos (Smith, 1980). Por otro lado, basándose en caracteres osteológicos, sugirió que ciertas especies de la subfamilia Empretrichthyinae pertenecían a la familia Goodeidae (Parenti, 1981). Así

mismo, por primera vez los grupos Empretrichthyinae y Goodeinae fueron considerados como grupos hermanos. A través de 28 loci aloenzimáticos, en 26 especies, se encontró congruencia acerca de las relaciones previamente descritas y al origen de la subfamilia (Grudzien *et al.* 1992). Este trabajo molecular no fue congruente con las relaciones de parentesco realizadas con caracteres osteológicos. Las relaciones evolutivas fueron mejor soportadas cuando se tomaron en cuenta ambos tipos de caracteres, morfológicos y moleculares, tanto con información de fragmentos nucleares, como mitocondriales (Meyer y Lydeard, 1993; Grant y Riddle, 1995; Costa, 1998; Webb, 1998, *et al.* 2004; Doadrio y Domínguez, 2004).

4.2 Características Biológicas de la Subfamilia Goodeinae

La subfamilia Goodeinae presenta características peculiares y de suma importancia que están asociadas a estrategias únicas de reproducción y desarrollo embrionario. Por un lado está la fertilización interna en la que los machos presentan una modificación en la aleta anal a manera de órgano copulatorio. Este órgano está formado por los primeros 5 a 7 radios anales, los cuales se encuentran reducidos y conforman una pequeña estructura abultada llamada espermatopodio. Esta estructura juega un papel crucial en la transferencia del paquete espermático al formar una pequeña bolsa cuando el espermatopodio es presionado contra la abertura genital de la hembra. En este momento, otro órgano muscular interno en forma de anillo se contrae y expulsa el paquete espermático, que lo introduce en la apertura genital de la hembra, produciéndose así la fertilización interna. Este delicado proceso que es necesario para lograr de forma exitosa la fertilización en los goodeinos ha tenido como consecuencia la formación de estrategias de selección sexual entre los miembros de la subfamilia y, aunado a ello, la aparición de un marcado dimorfismo sexual de algunos de los miembros de la subfamilia (Domínguez-Domínguez y Pérez Ponce de León, 2007). Estos procesos han sido ampliamente discutidos como una de las posibles causas de la gran radiación evolutiva de este grupo (Bisazza, 1997; Macías y Ramírez, 2005; Ritchie *et al.* 2005, 2007).

Otra característica es la forma de nutrición embrionaria, ya que, cuando el óvulo es fecundado en el folículo, este es expulsado hacia el lumen del ovario, estructura característica de los teleósteos vivíparos en la cual los dos ovarios se fusionan para formar uno solo. El saco vitelino es absorbido rápidamente, por lo que el embrión completa su desarrollo a través de un proceso de nutrición embrionaria llamada matrotofia; en la cual los embriones obtienen los nutrientes y gases necesarios para su desarrollo además de la eliminación de sustancias de desecho a través de los fluidos ováricos de la madre. Dicho proceso se lleva a cabo por el desarrollo de una estructura en la parte posterior del intestino de los embriones, en la parte ventral, a la altura del ano, la cual se le conoce como trofotenia; estructura altamente vascularizada que le permite al embrión el intercambio de sustancias y gases directamente del lumen ovárico (Uribe *et al.* 2004; Wourms, 2005; Domínguez-Domínguez y Pérez-Ponce de León, 2007). Sin embargo, se han reportado otros tipos de nutrición embrionaria dentro del grupo, diferentes formas y tamaños de trofotenia dependiendo de la especie y hasta su ausencia o su reducción en una especie (*Ataenobius toweri*).

La viviparidad confiere grandes ventajas. Por un lado, el nacimiento de las crías en un estado más desarrollado y con la capacidad de acceder a una gama mayor de artículos alimentarios al momento de nacer, lo que les permite tener una tasa de supervivencia mayor, sin embargo, el número de crías se ve reducida. Aún así, dentro de la subfamilia existen especies que poseen periodos fraccionados de reproducción a lo largo del año y tienen un alto número de crías, dicho proceso quizá puede verse reflejado en la mortalidad, influenciada directamente por la historia de vida de cada especie (Domínguez-Domínguez *et al.* 2007a).

4.3 El Género *Allotoca*

Dentro de la subfamilia Goodeinae, el género *Allotoca* (Hubbs y Turner, 1937) cuenta con 8 especies, siendo el género más diverso de esta subfamilia (Fig. 1), ocupando 8 regiones biogeográficas de las 18 reconocidas por Domínguez-Domínguez (2006): Chapala (CHA), Lerma Bajo (LER-B), Zacapu (ZAC),

Zirahuén (ZIR), Pátzcuaro (PAT), Balsas (BAL), Ameca (AME) y Cuitzeo (CUI) (Fig. 1). La diversificación del género posiblemente se dio durante el Pleistoceno, a causa de la gran actividad tecto-volcánica que trajo consigo el aislamiento de cuerpos de agua que antiguamente estaban conectados al sistema del Lerma: Zacoalco, Magdalena, Sayula, Cotija, Zirahuén, Cuitzeo, Valle de México, Verde y Santiago (De Buen, 1943, Tamayo y West, 1964). Las características derivadas que distinguen al género *Allotoca* son: boca aproximadamente horizontal; canal preorbital dividido; sistema del canal supraorbital carente de secciones: [3b-6a] para *A. diazi*, *A. meeki*, *A. catarinae* y *A. zacapuensis*, específicamente; ruptura del canal preopercular en ángulo del hueso preopercular. En contraste con *A. zacapuensis*; *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* presentan un mayor número de branquiespinas del primer arco branquial (10 a 13) y de poros preoperculares (10 a 11). Sin embargo, en las tres especies antes mencionadas, dichos caracteres se sobrelapan (Meyer *et al.* 2001).

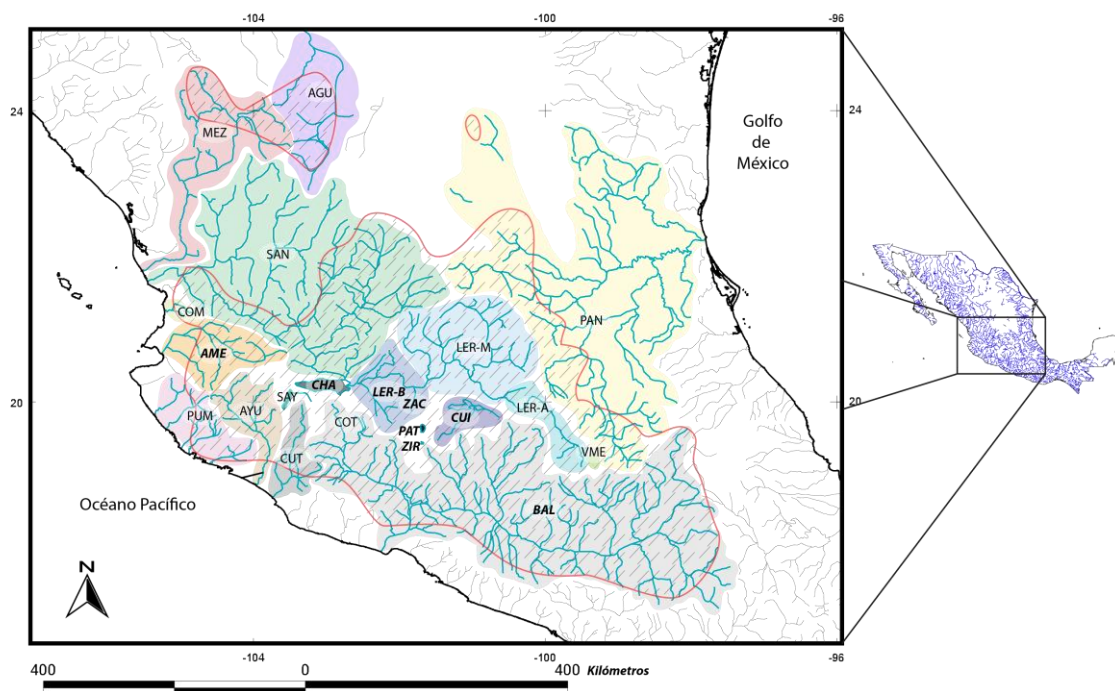


Figura 1. Distribución geográfica de la subfamilia Goodeinae (Línea Roja) y del género *Allotoca* (Negritas-Itálica). Los polígonos representan las regiones biogeográficas y sus divisiones reconocidas y caracterizadas por Domínguez-Domínguez *et. al* 2006, modificado por Corona-Santiago y Domínguez-Domínguez (2013). AGU, Aguanaval; MEZ, Mezquital; SAN, Santiago-Verde; COM, Huicicila-Compostela; AME, Ameca; PUM, Purificación-Marabasco; AYU, Ayuquila; SAY, Sayula; CHA, Chapala; CUT, Coahuayana-Tamazula; COT, Cotija; LER, Lerma (B, Bajo; M, Medio; A, Alto); ZAC, Zacapu; PAN, Panuco-Salado; CUI, Cuitzeo; PAT, Pátzcuaro; ZIR, Zirahuén; BAL, Balsas; VME, Valle de México.

4.4 El Complejo *Allotoca diazi*

En el género *Allotoca* existen tres especies que están estrechamente relacionadas, las cuales se encuentran en una fuerte controversia taxonómica (De Buen, 1942; Álvarez, 1959; Webb *et al.*, 2004; Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al.* 2012), la primera de ellas es *Allotoca diazi* (Meek, 1902), especie que se encuentra restringida al lago de Pátzcuaro, la segunda es *A. meeki* (Álvarez, 1959) endémica de la cuenca de Zirahuén y que actualmente sólo se encuentra en el manantial de Opopeo y tributarios del mismo y por último *A. catarinae* (De Buen, 1942) restringida al río Cupatitzio (Uruapan) en la cuenca del Balsas (Fig. 2).

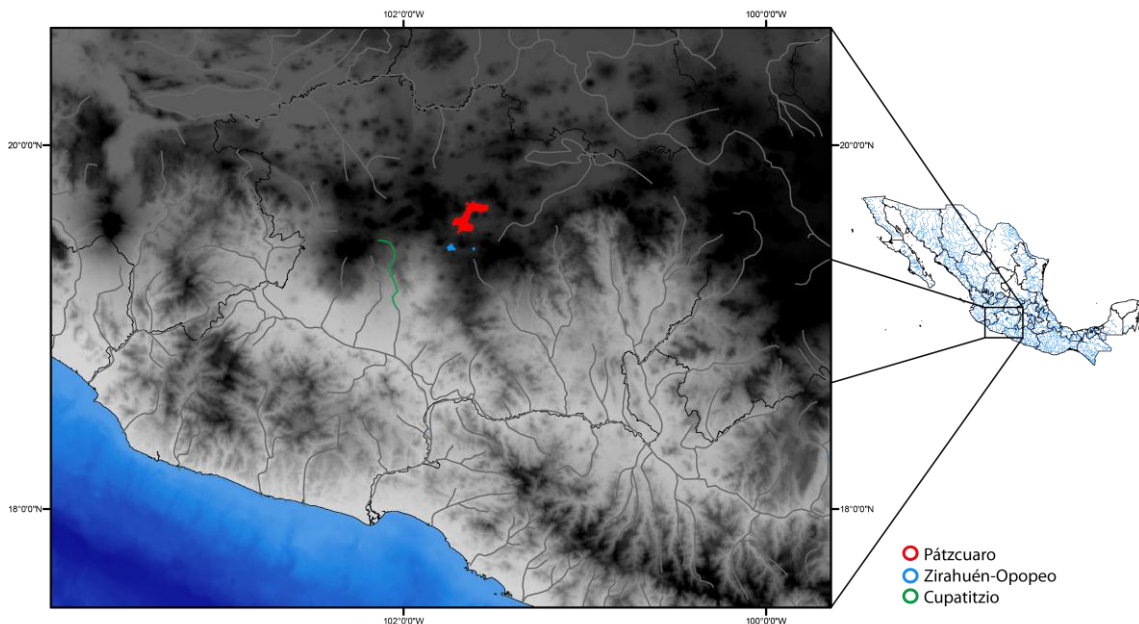


Figura 2. Distribución geográfica de las especies » *Allotoca diazi*, » *A. meeki* y » *A. catarinae*.

Allotoca diazi, *A. meeki* y *A. catarinae* habitan sistemas tanto lénticos como lóticos, pues las cuencas en las que habitan poseen arroyos y lagos. Sin embargo, las tres especies sólo se puede encontrar en sistemas con poca corriente y abundante vegetación. En la subcuenca del río Cupatitzio, sólo se le encuentra en sitios con estas características. Aunque no coexisten las tres especies; poblaciones de otras especies de la subfamilia goodeinae ponen en evidencia la posible conexión antigua entre los distintos sistemas hidrográficos en que habitan estas tres especies.

El grupo presenta las siguientes características morfológicas (Miller *et al.* 2005):

Sistema sensorial cefálico presente que consiste en poros y canales supraorbitales, mandibulares, lacrimales y preoperculares. Los dientes de la mandíbula exterior cónica en serie, redonda en la región transversal y sin hombros laterales o cúspides. Sexto radio pélvico no entre los radios anteriores y la pared del cuerpo, no conectado a la línea media ventral por membrana; cuerpo no marcado por fila posteroventral de barras de color negro o manchas; aleta dorsal y anal de los machos es delgada y pequeña.

4.4.1 *Allotoca diazi* (Meek, 1902). Chorumo.

El Holotipo es proveniente del Lago de Pátzcuaro, una hembra adulta de 66mm de longitud total depositado en el “Field Columbian Museum” en Chicago (No. Cat. 3618) como *Zoogoneticus diazi*. Se distribuye en la cuenca endorreica del Lago de Pátzcuaro. Actualmente no se encuentran registros en el Lago de Pátzcuaro. No obstante, está presente en manantiales y arroyos de la Ciénega de Tzurumútar-Chapultepec.

Puede encontrarse en agua turbias con lodo, rocas o arena, pero principalmente en aguas claras sin corriente o bien, corriente moderada y abundante vegetación; incluyendo algas verdes (*Chara*), pasto de agua (*Potamogeton*), mil hojas acuática (*Myriophyllum*) y lentejas de agua (*Lemna*). Presente hasta profundidades de 1m pero usualmente en profundidades menores a 0.6m. Suelen ser una especie demersal excepto mientras se alimentan, viviendo entre densas camas de vegetación por la ribera (Miller *et al.* 2005).

Los individuos son crípticamente coloreados, mezclado con el sustrato. Además, su coloración fue descrita como “oliváceo claro, con abundante moteado oscuro, con barras irregulares y dispuestas transversalmente, muchos individuos en el campo con tintes rojizos que se desvanece hasta un olivo claro uniforme y aletas más simples, claras y sin atributos. Los machos tienen una coloración más simple y uniforme que las hembras” (Fig. 3) (Meek, 1902).

Son primariamente carnívoros zooplantófagos: atrapan insectos que se encuentran sobre la superficie (Kingston, 1979). El intestino es proporcional a la longitud de su cuerpo, los dientes son largos y con forma cónica, mientras

que la boca es protráctil y más o menos larga, indicativo de una alimentación carnívora (Acuña *et al.* 2006).

Posee un periodo de gestación de 60 a 75 días, un periodo reproductivo que inicia en abril y que se extiende desde 8 a nueve meses, terminando en el mes de enero. Esto último puede indicar que tienen varios ciclos reproductivos o bien, las hembras comienzan su periodo reproductivo en distintos momentos (Mendoza, 1962).

Actualmente está incluida en la categoría de especie en peligro de extinción, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, y en la categoría de especie en peligro crítico de extinción, según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés). Su abundancia es muy baja en los manantiales donde actualmente está presente y se desconoce si está extirpada en el Lago de Pátzcuaro.



Figura 3. Macho de *Allotoca diazi*. ©Domínguez-Domínguez Omar.

4.4.2 *Allotoca meeki* (Álvarez, 1959). Tiro de Zirahuén.

El Holotipo de *Allotoca meeki* proviene del lago de Zirahuén, una hembra adulta de 52.1mm de longitud total sin conocerse el sitio en que fue depositado (Álvarez, 1959). Se distribuye en la cuenca endorreica del Lago de Zirahuén incluyendo los manantiales y arroyos que son tributarios del mismo. Sin embargo, no se tienen registros de esta especie en el Lago de Zirahuén durante los últimos 17 años. No obstante, se encuentra presente sólo en el manantial de Opopeo, el cual drena al Lago de Zirahuén.

Se encuentra en aguas claras, con abundante vegetación; *Chara*, *Potamogeton*, cola de zorro (*Ceratophyllum*), entre otras.

Su coloración ha sido descrita como “con muchas manchas castañas-grisáceas más o menos irregulares, que forman barras en la parte baja de los lados y del origen de la inserción de la parte posterior de la aleta dorsal. En algunos individuos, se superponen las manchas haciendo que no parezcan tan oscuras. Muchos individuos presentan manchas muy oscuras aisladas en la parte posterior del pedúnculo caudal, en la base de la aleta caudal. En la mayoría de los individuos, la mitad del dorso es menos manchado y se ve más brillante que por los lados. El vientre es muy claro, blanquecino o crema y sin presencia de manchas” (Fig. 4) (Álvarez, 1959).

La dentición de esta especie es idéntica a la de otros miembros del género *Allotoca*, lo cual sugiere que esta especie se alimenta de pequeños invertebrados e insectos (Camarena-Magaña, 2002).

Se han reportado juveniles a partir del mes de Febrero, sin embargo, su baja abundancia no ha permitido conocer más acerca de este tema directamente en campo (Miller *et al.* 2005).

Aunque posiblemente esta especie se encuentre extirpada en el Lago de Zirahuén, a causa de la introducción de especies exóticas como la Lobina (*Micropterus salmoides*) o la sobre explotación de los recursos naturales, esta especie no se encuentra incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 de especies en riesgo.



Figura 4. Hembra adulta de *Allotoca meeki*. ©Domínguez-Domínguez Omar.

4.4.3 *Allotoca catarinae* (De Buen, 1942). Tiro Catarina.

No se conoce el destino final del holotipo de esta especie. Sin embargo, proviene de la Presa Santa Catarina, también llamada presa Caltzontzin en el

municipio de Uruapan, Michoacán. Se distribuye en la subcuenca del río Cupatitzio, en la cuenca del río Tepalcatepec, perteneciente a la región hidrográfica del río Balsas.

Habita en aguas claras de arroyos de corriente moderada y embalses, con abundante vegetación con sustrato de rocas, arena, barro y limo (Miller *et al.* 2005).

La coloración de las hembras de *A. catarinae* fijadas en formol fue descrita como “parte dorsal oscura, pálido en el vientre, la nuca y las mejillas. La aleta dorsal, caudal y pectoral son suavemente sombreadas, la aleta ventral y anal son generalmente claras. Incluso si hay una coloración variable sobre los flancos, ningún espécimen muestra manchas alargadas, transversales o distintas bandas verticales. Las hembras juveniles son irregularmente moteadas (con tamaño de 20 a 24mm); alcanzan hasta 30mm, el color cambia a uniforme, mostrando un rastro de una banda longitudinal oscura en algunos individuos. En hembras más grandes, las manchas irregulares se vuelven más densas, dando a algunas hembras una apariencia gris uniforme. Sólo en el pedúnculo caudal se puede ver una cierta tendencia a formar trazas verticales a través de asociaciones de puntos” (Fig. 5) (De Buen, 1942).

Se alimenta primordialmente de organismos pequeños que se establecen en sustratos duros como las rocas y material detrítico cernido del material limoso. Sin embargo, mirando la dentición, forma y tamaño de la boca, al igual que otros miembros del género, posiblemente se alimente de pequeños invertebrados siendo de igual forma carnívoro.

Se estima que el periodo de reproducción es muy largo puesto que se han encontrado hembras grávidas a partir del mes de febrero, inclusive se han capturado crías durante el mes de agosto (De Buen, 1942).

Allotoca catarinae se encuentra incluida actualmente en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 de especies en riesgo como en peligro de extinción. Por otro lado, sus poblaciones se encuentran en decremento a causa de las descargas de aguas residuales en el río Cupatitzio.



Figura 5. Macho (Derecha) y hembra (Izquierda) adultos de *Allotoca catarinae*. ©Domínguez-Domínguez Omar.

4.5 Hipótesis Biogeográficas

Existen dos hipótesis biogeográficas que tratan de explicar la actual distribución de las tres especies estrechamente relacionadas, por medio de conexiones entre diferentes lagos del centro de México:

- a) De Buen (1943), basado en criterios ictiofaunísticos, propone que el lago de Cuitzeo estaba unido a los lagos de Zirahuén, Pátzcuaro y Chapala durante el Mioceno (Fig. 6). Dicha hipótesis es soportada por la distribución de especies del género *Chirostoma* (Barbour, 1973) y criterios biogeográficos, así como por conexiones de sistemas acuíferos subterráneos (Bradbury, 2000). Sin embargo, se ha descrito esta conexión de distinta manera, la cual explica la conexión indirectamente entre Cuitzeo y Pátzcuaro, por pequeños tributarios entre Zacapu y Cuitzeo cuya conexión que se considera fue interrumpida hace 700 mil años aproximadamente (Israde-Alcántara y Garduño-Monroy, 1999) y de Zirahuén a Pátzcuaro hasta Zacapu (Garduño-Monroy e Israde-Alcántara, 1998; Bradbury, 2000; Moncayo *et al.* 2001).

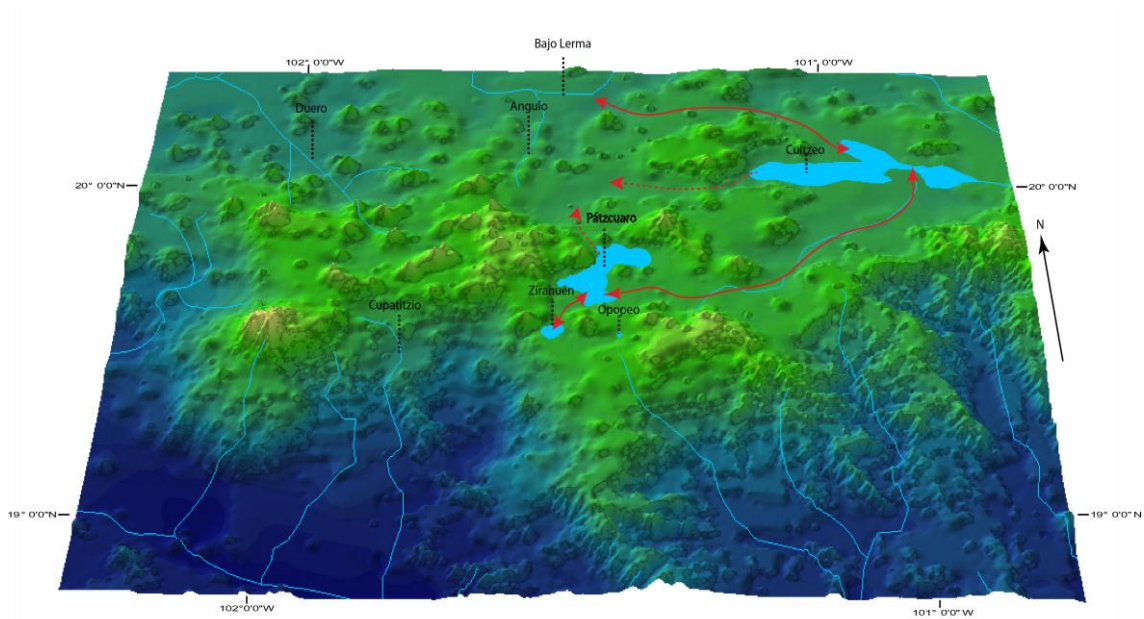


Figura 6. Hipótesis Biogeográfica: De Buen (1943). Las flechas en Rojo representan las conexiones propuestas en esta hipótesis. Las líneas punteadas representan las conexiones propuestas por Garduño-Monroy e Israde-Alcántara (1998), Israde-Alcántara y Garduño-Monroy (1999); Bradbury (2000) y Moncayo et al. (2001).

- b) Álvarez (1972) consideró la existencia de un tributario que corría a partir del río Balsas; el río Cupatitzio en Uruapan hacia Zacapu, pasando por Zirahuén y Pátzcuaro (Fig. 7), cuyo flujo fue interrumpido por actividad tectónica hace aproximadamente 1MA - 700 mil años. Pero dicha aseveración no ha sido bien soportada ya que no hay congruencia cronológica entre los orígenes de los lagos Zacapu y Zirahuén. Por un lado, los eventos tecto-volcánicos que formaron Zirahuén datan del Cuaternario, en el Pleistoceno, mientras que aquellos que generaron la depresión de Zacapu son del periodo Mio-Pleistoceno (Istrate-Alcántara, 2002).

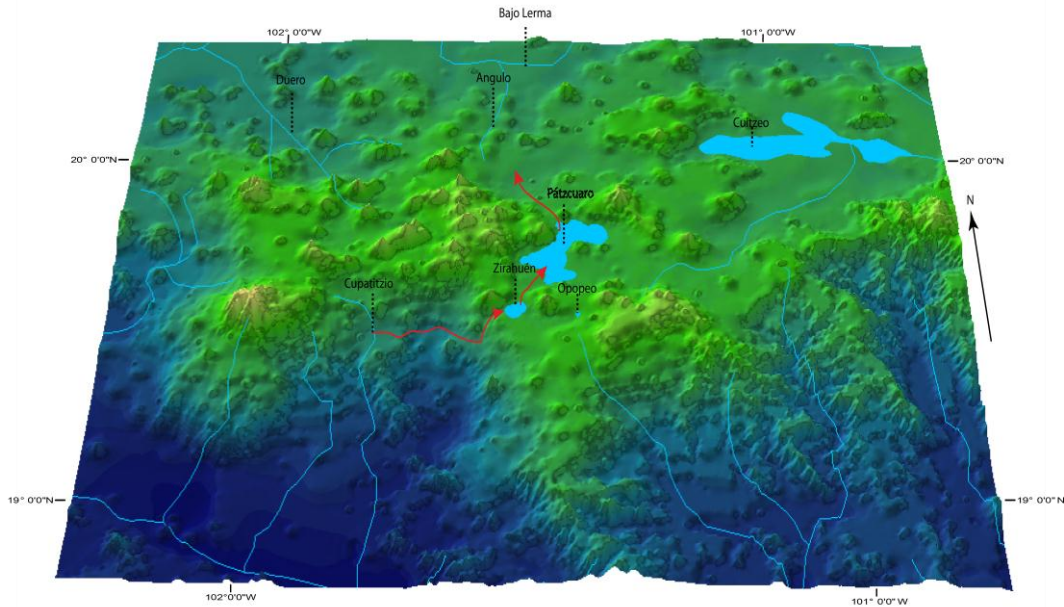


Figura 7. Hipótesis biogeográfica: Álvarez (1972). Las flechas en rojo representan las conexiones propuestas en esta hipótesis.

4.6 Evidencias de conexiones entre lagos de Cuitzeo, Zacapu, Pátzcuaro y Zirahuén

La configuración actual de los lagos pertenecientes en algún momento al sistema del río Lerma está dada por una serie de eventos que datan desde el Mioceno Tardío e intensificándose durante el Pleistoceno. Dichos eventos están ampliamente relacionados con la fuerte actividad tecto-volcánica y cambio climático tras la formación del Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) (Moncayo *et al.* 2001; Israde-Alcántara *et al.* 2002, 2005). Por un lado, trajo consigo el levantamiento de la Mesa Central atribuido a la actividad de las fallas Taxco-Querétaro y Morelia-Acambay en el centro sur de México (Moncayo *et al.* 2001; Garduño-Monroy *et al.* 2009), cuyo fenómeno separó principalmente la cuenca del río Lerma.

Conexión Cuitzeo-Zacapu

El lago de Cuitzeo está ubicado al norte del estado de Michoacán con orientación Este a Oeste y es considerado actualmente dentro del sistema del Lerma (Medio, Fig. 1), es resultado de los eventos de vulcanismo durante el Mioceno Tardío, construyendo la depresión en la que hoy se sitúa (Istrade-Alcántara *et al.* 2002, 2010).

De acuerdo a información morfotectónica e ictiológica, se ha sugerido que en algún momento los Lagos de Cuitzeo y Zacapu (actualmente Laguna de Zacapu pertenece a la subcuenca del Angulo en Lerma Bajo) se encontraban comunicados durante el Plioceno y Pleistoceno a través de amplios canales (Moncayo *et al.* 2001), éste último también de origen Miocénico. Esta conexión permitió la dispersión de la ictiofauna entre dichos cuerpos de agua.

Cabe destacar que la información tecto-volcánica, paleoclimática e ictiofaunística del antiguo lago de Zacapu, sugiere que la separación de dicho cuerpo de agua con Cuitzeo tuvo lugar durante el Pleistoceno-Holoceno. Periodos relacionados con fluctuaciones en el nivel de los lagos y vulcanismo. Ambos se encuentran en el actual Campo Volcánico de Michoacán-Guanajuato o bien el Corredor Tarasco (Hasenaka, 1994; Garduño-Monroy *et al.* 2009), región que pertenece al CVTM orientado de Norte a Sur del estado de Michoacán con alta actividad desde su origen hasta la actualidad y con más de mil conos volcánicos (Mioceno Tardío-Pleistoceno) (Garduño-Monroy *et al.* 2009; Israde-Alcántara *et al.* 2005, 2010). Dicha actividad ha causado el aislamiento de Zacapu y Cuitzeo, además del represamiento del Lago de Pátzcuaro. La separación entre Zacapu y Cuitzeo es tan reciente como la de los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén (durante Plioceno y Pleistoceno) (Moncayo *et al.* 2001; Israde-Alcántara *et al.* 2002, 2005, 2010; Ortega *et al.* 2002).

Conexión Zacapu-Pátzcuaro

La conexión entre el antiguo lago de Zacapu y el lago de Pátzcuaro es incierta. Sin embargo, la estrecha relación de la ictiofauna y las importantes estructuras morfotectónicas y volcánicas en la región sugieren una posible conexión reciente y congruente a los orígenes de dichos cuerpos de agua. Por un lado está la Sierra de Zirate, emplazamiento volcánico formado durante el último millón de años formando los embalses de los límites nororientales del lago de Pátzcuaro y además, la formación del semiescudo volcánico noroccidental en donde destaca la actividad del volcán El Bosque, proceso altamente activo durante el Pleistoceno Tardío (De Buen, 1944; Robles-Camacho *et al.* 2010). De estos, el primer evento mencionado quizá sea el más importante en el aislamiento del lago de Pátzcuaro con el paleosistema del río Lerma (Fig. 8). En Pátzcuaro las fluctuaciones en el nivel lacustre y en el clima tuvieron gran

importancia en la actual configuración del lago y la colonización y aislamiento de la ictiofauna de otros cuerpos de agua, producto de dichos cambios durante el Pleistoceno y Holoceno, reflejado en discordancias y disconformidades en perfiles estratigráficos (Israde-Alcántara *et al.* 2002, 2005; Vázquez *et al.* 2010).

Conexión Pátzcuaro-Zirahuén

Zirahuén parece no tener ninguna relación con el sistema del medio Lerma y sólo con Pátzcuaro (De Buen, 1943; Moncayo *et al.* 2001; Israde-Alcántara *et al.* 2002). La información ictiofaunística y paleoclimática sugiere que la conexión Pátzcuaro-Zirahuén es muy reciente (<1MA) y que su aislamiento puede deberse a los siguientes eventos:

Zirahuén por un lado, fue represado durante los últimos 30 mil años en el Pleistoceno, tras el emplazamiento de flujos de lava al occidente de la cuenca. Sin embargo, no se descarta la existencia de una conexión con Pátzcuaro después de su formación (Ortega *et al.* 2010).

Los eventos que finalizaron con el aislamiento de la cuenca de Zirahuén con respecto a Pátzcuaro y las poblaciones de peces, quizá tuvieron lugar durante los últimos 28,000 años, tras la alta actividad del CVTM, trayendo consigo el surgimiento y actividad del volcán El Estribo; en el vaso sureste del lago de Pátzcuaro, (Fig. 8), formando un escarpe que se extiende de Este a Oeste con más de 200m de desnivel y hacia el oriente toma una dirección Norte-Sur a manera de abanico. Esta actividad volcánica provocó un colapso y deslizamiento de material que generó una importante reducción en dicha región del litoral del lago de hasta más de 9 km² (Israde-Alcántara *et al.* 2005, Garduño-Monroy *et al.* 2009). La actividad de El Estribo y el fallamiento del mismo nombre, ayudó a la formación del volcán la Taza, el cual tuvo su origen hace 8,000 años aproximadamente.

Zirahuén es alimentado por el río La Palma cuyo cause fue cerrado por la actividad del volcán La Magueyera, donde los flujos más jóvenes tienen una edad entre los 13,000 y 6,000 años (Ortega *et al.* 2010; Vázquez *et al.* 2010) (Fig. 8).

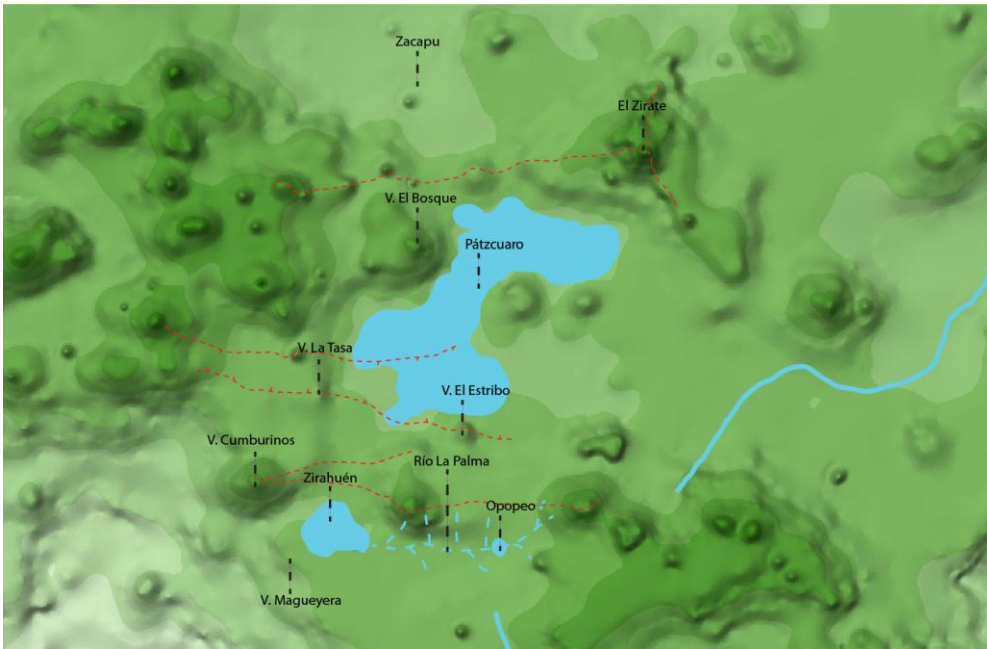


Figura 8. Localización de los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén y principales estructuras volcánicas a su alrededor. Líneas en rojo representan el conjunto de estructuras ligadas al sistema de fallas Morelia-Acambay, Este a Oeste.

4.7 La Subcuenca del Río Cupatitzio

El río Cupatitzio se encuentra dentro de la región denominada como Depresión del Balsas. Es una pequeña porción de la cuenca del río Balsas que pertenece a una de las dos fracciones en las que se divide la depresión: La cuenca del río Tepalcatepec. Esta región también es llamada Depresión del Bajo Balsas (Fig. 9), donde en las partes altas de la región (1600msnm) nace el río Cupatitzio, específicamente en la ciudad de Uruapan. A su vez, el río Cupatitzio cambia de nombre (río Marqués) en la zona llamada “El Salto” o “Presa Cupatitzio”. El río el Marqués drena al río Tepalcatepec, en la cuenca del Balsas.

La depresión del Balsas se encuentra en una zona de convergencia entre las placas de Cocos y Americana. Como tal, está enmarcada por dos rasgos estructurales de primer orden: una trinchera oceánica (La Trinchera mesoamericana: Fosas de Petacalco y Acapulco) y dos sistemas de cadenas montañosas continentales (CVTM y la sierra Madre del Sur) (Toledo, 2003). Lo que hacen de esta región una zona tectónicamente activa y altamente dinámica.

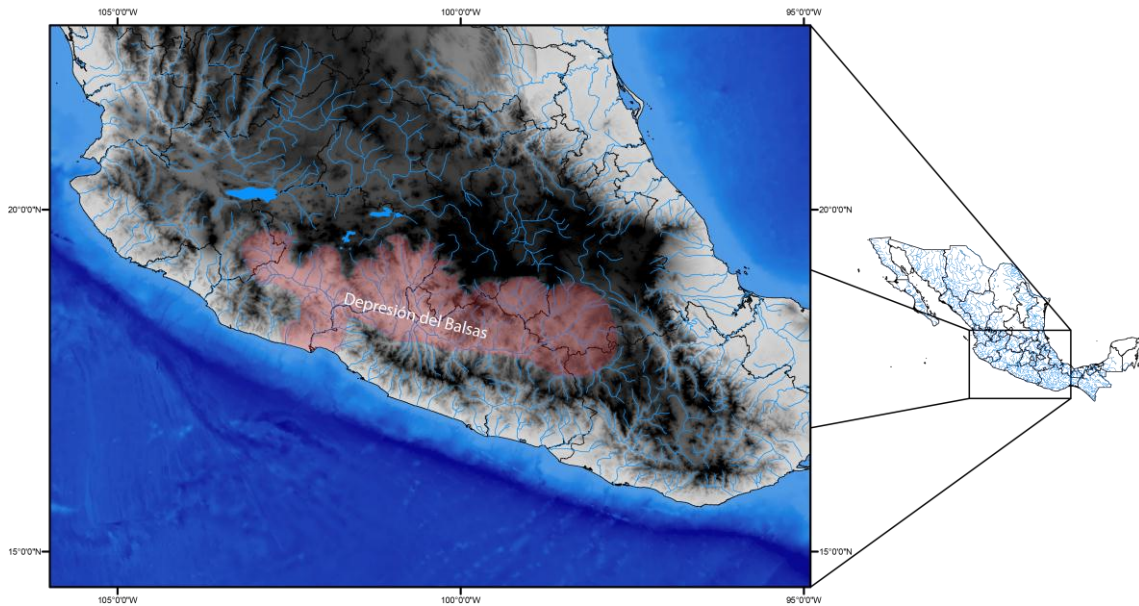


Figura 9. Localización de la Depresión del río Balsas en la República Mexicana.

La actual configuración de la depresión del Balsas está dada por varios eventos. Con un origen probable durante el Cretácico Inferior (~99-140MA) sin embargo su consolidación fue hasta el surgimiento del CVTM (~30MA), esto sugiere una fuerte actividad por más de 100MA y con mayor intensidad durante finales del Oligoceno e inicios del Mioceno (~30MA). (López-Ramos, 1981; Ferrari *et al.* 2002; Nieto-Samaniego *et al.* 2006; Gómez-Tuena *et al.* 2005). No está claro el periodo en que se originó la subcuenca del río Cupatitzio. Su origen puede remontarse a inicios del Cenozoico (~65MA) (Toledo y Bozada, 2002).

La antigua cuenca del Balsas era una región inundada que conformaba un litoral interior, pero la alta actividad volcánica terminó por formar un mar interior en la depresión. Durante este periodo el vaso lacustre, se vio afectado por nuevos movimientos orogénicos como antes se mencionó, que dieron lugar a fracturas o líneas de debilidad sobre la sierra Madre del Sur que permitieron al agua abrirse paso hacia el mar, formando el río Balsas (Tamayo, 1949 y 1958, Toledo y Bozada, 2002).

Los valles de la cuenca del río Tepalcatepec se caracterizan por estructuras y depósitos volcánicos con actividad durante el Jurásico-Cretácico (~150MA). Sin embargo, a partir del Mioceno, la región Sur de la cuenca del Tepalcatepec no tuvo actividad volcánica. Pero inmediatamente al norte de esa zona, en la

región del río Cupatitzio, la actividad se intensificó con la fuerte actividad del CVTM y la del Corredor Tarasco durante el Plioceno. A partir del Plioceno y con mayor intensidad en el Pleistoceno y hasta la actualidad, esta región es un recipiente de descargas volcánicas y de productos erosionados de aparatos volcánicos del Corredor Tarasco (Garduño-Monroy, 2005). La actividad geológica que pudo configurar la actual estructura del río Cupatitzio fue la del volcán Tancítaro con un origen datado en 0.53 ± 0.06 MA en primera instancia (Ban *et al.* 1992), sin embargo recientemente se ha estimado que tuvo su origen hace 0.793 ± 0.022 MA. El colapso de dicho volcán fue el evento más importante en la estructura del río Cupatitzio, el cual tuvo lugar entre hace $0.261-0.238$ MA (Ownby *et al.* 2007; Morelli *et al.* 2010). La meseta donde se ubica Uruapan y donde se origina el río Cupatitzio, decae abruptamente hacia el río Tepalcatepec (de 1600msnm a 200msnm). Estos hechos permiten identificar más claramente la relación entre el CVTM y la Sierra Madre del Sur y definir sus límites. Sin embargo, quizá estos últimos hechos sean la única relación que tiene el río Cupatitzio con la región en que se encuentran los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén pero no sugiere ninguna conexión entre sí. Dicha actividad creó una multitud de sistemas en las numerosas estructuras montañosas de la región, que hicieron de la cuenca un notable centro de radiación evolutiva.

4.8 Trabajos Previos de Genética de la Ictiofauna Dentro de la Región

Algunos trabajos con peces de agua dulce del centro de México han puesto a prueba las conexiones recientes entre los lagos de Zirahuén, Pátzcuaro, Zacapu y Cuitzeo. Por ejemplo; en un estudio filogeográfico de la especie *Zoogoneticus quitzeoensis*, un endemismo del sistema Lerma-Santiago, se encontró evidencia de flujo génico reciente y baja diferenciación genética entre las poblaciones de Zacapu y Cuitzeo, datando el evento de expansión poblacional en ~790,000 años. Soportando la idea de la antigua conexión entre estos cuerpos de agua. Además, propone una conexión entre Zacapu y Cuitzeo a través del río localizado en la región Chucándiro-Huaniqueo (Domínguez-Domínguez *et al.* 2008).

En un análisis de las relaciones filogenéticas del género *Algansea* (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2009) dataron el evento cladogenético de *A. lacustris* Steindachner 1895; un endemismo del lago de Pátzcuaro, en ca. 1.9MA. Esta datación no concuerda con respecto a los tiempos de separación más recientes para el aislamiento de este lago con otras cuencas del sistema Lerma-Chapala. Esta inferencia es congruente con respecto a la relación propuesta por De Buen (1943), pero no a los tiempos de separación propuestos por Álvarez (1972), en lo que a estas cuencas respecta.

Otra de las investigaciones que encuentran resultados contradictorios mediante un estudio filogeográfico de las poblaciones del goodeido *Alloophorus robustus* (Domínguez-Domínguez, 2008), encontraron el mismo haplotipo para Zirahuén y Pátzcuaro, reforzando la historia de conexión entre estos ríos. Por su parte, las 3 muestras de esta misma especie incorporadas en el análisis de la población del río Cupatitzio, codistribuida con *A. catarinae*, presentaron un solo haplotipo, el cual es compartido por las poblaciones de La Luz y La Alberca, ambas en la región del río Duero, en la cuenca del Bajo Lerma. En relación a estos inesperados resultados, se concluyó que no existe ninguna evidencia ni biológica, ni geológica que demuestre una conexión reciente del Bajo Lerma con el río Cupatitzio, por lo que mencionan que la presencia de *Alloophorus robustus* en esta región puede deberse a una introducción realizada por el hombre.

Por otro lado, en un trabajo previo, se ha encontrado que las poblaciones de dos localidades diferentes de *Allotoca catarinae* (Presa Cupatitzio y Presa Sta. Catarina), presentan entre ellas mayor divergencia genética ($p=0.9\%$) que entre las especies *A. catarinae*, *A. meeki* y *A. diazi* ($p=0.6-1.1\%$), teniendo así que las distancias genéticas entre éstas tres especies se encuentra por debajo de la media registrada para especies hermanas de goodeidos (1.7-11%) (Doadrio y Domínguez-Domínguez; 2004). Además, se observaron relaciones parafiléticas entre éstas tres especies y sus poblaciones (Domínguez-Domínguez *et al.* 2012).

4.9 Filogeografía y Marcadores Moleculares

El estudio de la distribución geográfica de los linajes genealógicos, a través de las relaciones de ancestría-descendencia, es lo que define a la filogeografía (Avice *et al.* 1987). Dado que implica el estudio de aspectos históricos de la actual distribución de los linajes genealógicos, es considerada como una subdisciplina de la biogeografía histórica. La filogeografía integra conceptos y técnicas de biología molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avice *et al.* 2000). También es mencionada como un puente entre la microevolución (relaciones tocogenéticas) y la macroevolución (relaciones jerárquicas), estando así dentro de la Biología Evolutiva (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). La filogeografía comúnmente se ha utilizado como una herramienta para esclarecer patrones evolutivos a nivel intraespecífico. Sin embargo en la última década se ha utilizado para describir procesos demográficos históricos involucrados como lo son: flujo génico, tamaño efectivo poblacional, procesos y secuencias de colonización, cuellos de botella y también para determinar barreras entre especies y los procesos que las conforman. Por otro lado, tiene gran importancia en la conservación, puesto que permite reconocer la estructura genética de los organismos e identificar unidades de conservación (Avice *et al.* 2000; Freeland, 2005).

Citocromo b (Cytb)

El gen *Cytb* ha resultado ser un marcador altamente informativo para responder preguntas a nivel específico y poblacional dentro del grupo de los Goodeines, incluyendo las tres especies del género *Allotoca* tratadas en la presente investigación (Doadrio y Domínguez-Domínguez 2004), más aún, en general, el ADN mitocondrial se ajusta a las teorías de neutralidad y coalescencia, es decir, presenta una elevada tasa de mutación y no recombina (Lanteri y Confalonieri, 2003). Por otra parte los haplotipos o variantes del ADNmt registran una historia matrilineal de eventos mutacionales, por lo que es posible conectarlos de un modo filogenéticamente inteligible en un filograma, el cual se puede sobreponer a la distribución geográfica del grupo de estudio, dando lugar a su reconstrucción filogeográfica (Avice, 2000).

El *Cytb* es un marcador molecular con un gran uso dentro de los trabajos filogenéticos y filogeográficos; principalmente cuando se trata de estudios de relaciones en bajos niveles taxonómicos (Farías, 2001; Meyer, 1994).

Puede presentar alta y baja tasa de recambio en las diferentes posiciones del codón. Esto último es de gran importancia ya que es uno de los problemas principales que presenta este gen: la primera y segunda posición del codón están sujetas a limitada variabilidad o en algunos casos es invariable resultando poco informativo en trabajos que exigen relaciones evolutivas a profundidad (Meyer, 1994; Voelker y Edwards; 1998).

Microsatélites

Son fragmentos cortos conformados por repeticiones en tándem de uno a 6 nucleótidos. El número de repeticiones es muy variable debido a su alta tasa de mutación. Por lo tanto, su variación se da por el número de repeticiones o longitud (Ellegren, 2004).

Se ha demostrado su cualidad neutra y codominante, es decir, que es posible identificar heterocigotos de homocigotos, puesto que cada individuo puede tener uno o más alelos de un locus según su estado de ploidía (Hancock, 1996, Kruglyak *et al.* 1998).

Para un Marcador neutral, el grado de polimorfismo es proporcional a la tasa subyacente de mutación. Dado el grado de polimorfismo de los microsatélites, se deduce que las mutaciones se producen con mayor frecuencia (Ellegren, 2004).

Flanqueados por regiones conservadas en los extremos, permiten ser amplificados mostrando una gran variación (a nivel de individuo) considerándose como una de las partes más variables del genoma (Bell & Jurka, 1997; Kruglyak *et al.* 1998; Nielsen *et al.* 1999; Ellegren, 2000).

El uso de estos marcadores en el presente trabajo se ve favorecido debido al uso de microsatélites en especies de goodeinos: *Xenophorus captivus*, *Ameca splendens*, *Characodon audax*, *Ilyodon whitei* y el género *Zoogoneticus*, de los cuales se han obtenido una amplia gama de microsatélites que han resultado con alto grado de polimorfismo (Boto y Doadrio, 2003; Hamill *et al.* 2007).

Los microsatélites son comúnmente utilizados para estudios a nivel intraespecífico y su utilización entre especies puede reducir su eficacia cuando aumenta la divergencia genética entre ellas. Por lo que en este estudio se ha probado el nivel informativo de cada uno de los microsatélites disponibles.

La información de ambos marcadores moleculares, con tasas de mutación variable, complementaran los resultados obtenidos corroborando o complementando posibles escenarios biogeográficos. Lo cual aportará mayor información para clarificar los procesos evolutivos que han configurado la actual distribución de las tres especies de estudio, su estructura actual y proponer criterios para su conservación.

V. Justificación

El conocer la historia evolutiva de *Allotoca catarinae*, *A. meeki* y *A. diazi*, nos permitan conocer los eventos y procesos biogeográficos que han influido en la conformación de la diversidad de estas tres especies, todo ello, bajo la hipótesis de que la historia evolutiva de estas especies se encuentra estrechamente vinculada a la separación o unión de los sistemas hidrográficos en los que habita, por lo que también se podrán poner a prueba las hipótesis paleohidrográficas de esta región del país.

Además, esta información nos permitiría sugerir divergencias genéticas y patrones de relaciones entre las poblaciones y entre las tres especies y con ello aportar información que ayude a esclarecer la controversia taxonómica de este grupo. Por otro lado, la identificación de linajes evolutivos dentro de cada una de las especies y la variabilidad genética de sus diferentes poblaciones, serán útiles para la determinación de unidades de conservación. Por lo anterior, la búsqueda y entendimiento de los procesos evolutivos en el contexto de la compleja historia geológica de la región es el propósito fundamental de la presente tesis, para con ello hacer inferencias biogeográficas, taxonómicas y de conservación.

VI. Hipótesis

La historia evolutiva de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* se encuentra estrechamente vinculada a la separación o unión de los sistemas hidrográficos en los que habitan.

VII. Objetivo General

Obtener la historia evolutiva de *Allotoca diazi*, *A. catarinae* y *A. meeki* en todo su rango de distribución.

VIII. Objetivos Particulares

- Describir los patrones filogeográficos de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* y sus implicaciones taxonómicas.
- Estimar la demografía histórica de las especies.
- Poner a prueba las hipótesis biogeográficas previas.
- Asociar los patrones filogeográficos y demográficos con la información geológica y climática del Centro de México.
- Identificar las unidades operativas de conservación para las tres especies.

IX. Materiales y Métodos

9.1 Muestreo

Con el propósito de poder representar por completo el rango de distribución de las tres especies, se visitó la cuenca endorreica de Pátzcuaro, tanto el lago como manantiales aledaños para el caso de *Allotoca diazi*, la región del río Cupatitzio y sus tributarios, en la cuenca alta del Balsas para *A. catarinae* y para la especie *A. meeki*, se visitó la cuenca endorreica de Zirahuén.

Los organismos fueron colectados con equipo de electropesca, con redes tipo chinchorro y redes de mano.

Se obtuvo tejido de la aleta pectoral y/o caudal para extracción de ADN, amplificación del gen *Cytb* y secuenciación de individuos de las poblaciones de las tres especies, así como para el genotipado de los microsatélites. Para *Allotoca catarinae*; se visitaron un total de 7 localidades de las cuales, en sólo cuatro se encontró la especie. En el caso de *A. diazi*, se colectaron organismos en sólo una población (Manantial Chapultepec) de las dos visitadas y existentes. Finalmente, para *A. meeki* se colectaron individuos de la única población existente (Opopeo) (Tabla 1, Fig. 10). Los tejidos se preservaron en alcohol absoluto y se refrigeran a -20°C. Algunos organismos fueron fijados y depositados en la Colección de Peces de Universidad Michoacana para su registro; el resto de los organismos fueron liberados.

Se realizaron colectas desde el mes de marzo hasta el mes de agosto del 2011. Sin embargo, en el caso de *Allotoca diazi* no se logró colectar individuos de la población del Lago Pátzcuaro.

Tabla 1. Número de organismos colectados para cada especie en su rango de distribución.

Especie	n	Localidades	Coordenadas	Estado
<i>A. catarinae</i>	22	Presa Santa Catarina	N 19°25'18.39" W 102°00'59.9"	Presente
	22	Parque Urbano Ecológico	N 19°23'23.7" W 102°00'51.8"	Presente
	31	El Sauco	N 19°20'58.4" W 104°04'50.6"	Presente
		La Tzararacuita	N 19°23'18.3" W 102°03'42.7"	Ausente
		La Tzararacuita-Norte	N 19°21'1.5" W 102°04'57"	Ausente
		Zumpimito	N 19°23'18.3" W 102°03'42.7"	Ausente
	18	Presa Cupatitzio	N 19°20'33.4" W 102°08'00.8"	Presente
<i>A. diazi</i>		Pátzcuaro		Posiblemente Presente
	26	Manantial Chapultepec	N 20°34'19.1" W 101°31'29.3"	Presente
<i>A. meeki</i>		Zirahuén	N 19°27'00" W 101°45'00"	Extirpada
	17	Opopeo	N 19°24'22" W 101°36'13.5"	Presente

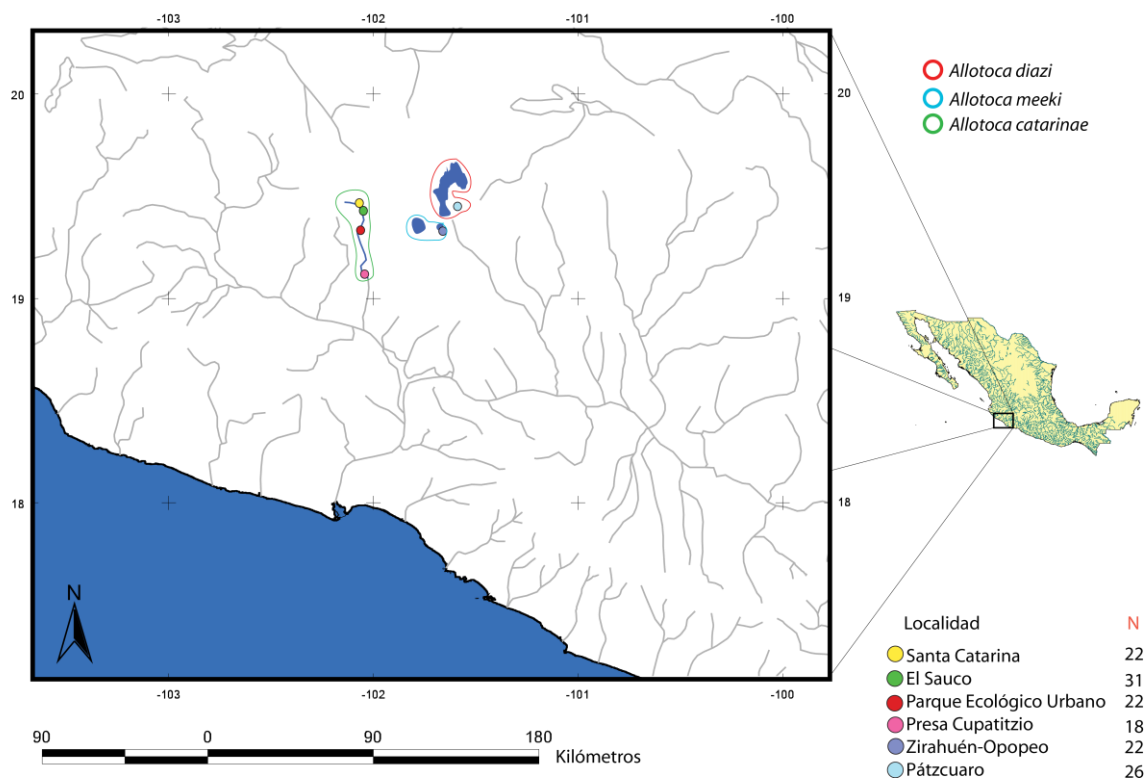


Figura 10. Localidades de colecta para las tres especies. N = tamaño de muestra por localidad.

9.1.1 Obtención de Secuencias.

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo “Fenol-Cloroformo” a través de la digestión previa por medio del método convencional de CTAB-Proteinasa K. Para el caso de *Allotoca meeki*, se utilizó el método de digestión por medio de SDS-Proteinasa K. Este cambio en la metodología se realizó por dificultades en conseguir estabilidad del pH en el CTAB.

Se realizó la amplificación del gen mitocondrial Citocromo *b* (1140 pb) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers presentados en Machordom y Doadrio (2001):

GLuDG (*forward*) 5' TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG 3'

H16460 (*reverse*) 5' CGA YCT TCG GAT TAA CAA GAC CG 3'

Se realizaron reacciones individuales a 12.5µl con una concentración final de 0.2µM de cada primer, 0.25mM de cada dNTP, 1.5M de MgCl₂ y 1U de *Taq* ADN polimerasa. Se sometieron a un proceso en termociclador de reactivación de la ADN polimerasa por 2min a 94°C más 45seg a la misma temperatura para el proceso de desnaturalización de ADN, 1min a 46°C para el alineamiento de los primers y 1.5min a 72°C para la síntesis, llevando a cabo 35 ciclos a partir de la desnaturalización. Además se incluyó un periodo de síntesis final por 5min a 72°C. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y visualizados a través de luz UV, teñidos bajo Sybr-Safe. Los fragmentos amplificados fueron enviados a servicio de secuenciación en Macrogen-Korea y htSEQ (High-Throughput Sequencing of Washington University).

9.1.2 Obtención de Genotipos.

Se utilizaron los primer obtenidos en Boto y Doadrio (2003) y Hamill *et al.* (2007), que se han identificado para miembros de la subfamilia Goodeinae bajo diferentes condiciones de PCR. Para ello se probaron cada uno de ellos (20 en total) para corroborar su amplificación y que fueran polimórficos en las especies del presente trabajo. Se utilizó el siguiente programa de PCR: 95°C durante 2min para el proceso de reactivación de la polimerasa, 95°C durante un periodo de 30seg para la desnaturalización del ADN. El alineamiento de los primers se llevó a cabo a una temperatura de 43-60°C durante 30seg 72°C por 30seg para la síntesis de ADN. Este proceso se repitió durante 35 ciclos a partir de la

desnaturalización. Por último un periodo de 5min a 72°C para la elongación final. Cada reacción de PCR consistió en reacciones de 12.5µl con una concentración final de 0.2µM de cada primer donde el forward posee marcaje por fluorocromo (distinto para cada primer) para la determinación de la longitud del fragmento en el secuenciador, 0.25mM de cada dNTP, 1.5M de MgCl₂ y 1U de Taq ADN polimerasa. Cada uno de ellos se envió a genotipar para determinar su condición de variabilidad. Una vez caracterizada sus condiciones para su amplificación por medio de Multiplex PCR y la variabilidad de cada uno dentro del grupo de especies, se procedió a su amplificación en todos los individuos en los que anteriormente se obtuvo para *Cytb*. Seguido de su amplificación, se envió a servicio de genotipado para su posterior análisis.

Se probaron y amplificaron los 20 pares de primers que se han identificados para miembros de la subfamilia Goodeinae bajo diferentes condiciones de PCR (Tabla 4).

En primera instancia, se realizaron combinaciones para determinar las longitudes y descartar solapamiento entre ellos de color de fluorocromo y tamaño. Además, se evaluó la concentración de producto de PCR para la determinación de la cantidad óptima para el genotipado.

El genotipado para los 20 microsatélites se realizó en sólo 16 muestras: 6 para *Allotoca diazi*, 5 para *A. meeki* y 6 para *A. catarinae*. Esto se realizó con el objetivo de determinar cuáles de ellos son polimórficos para las especies estudiadas en el presente trabajo. Dentro de los 20 loci de microsatélites disponibles, se encontraron sólo 8 polimórficos, 4 monomórficos y el resto posiblemente no sean fragmentos de tipo microsatélite, quizá por ser muy específicos para las especies que fueron diseñados.

El análisis de los fragmentos genotipados se realizó mediante el software GeneMapper v4® y Peak Scanner v1 Applied Biosystem, con el cual se pudieron caracterizar los alelos pertenecientes para las 16 muestras de las 3 especies antes mencionadas.

La calidad de los genotipos de microsatélites (frecuencia de alelos nulos y el error causado por la desviación del equilibrio de ligamiento) se analizó a través del Software ARLEQUIN v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010) y Micro-Checker v2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004).

9.2 Análisis de Datos

9.2.1 Cytb.

Diferencia entre Secuencias e Inferencia Filogenética

Las secuencias fueron revisadas y alineadas mediante software de alineamiento manual a través del software MEGA v5.2 (Tamura *et al.* 2011). Para conocer el modelo evolutivo de sustitución que más se ajusta a las secuencias, se usó el programa jMODELTEST v3.7 (Posada, 2008) utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés) como método de elección. El modelo obtenido fue Transitional Model (Posada, 2003) + Proporción de Sitios Invariables + Gamma (TIM+I+G), (Tabla 2).

Se obtuvieron las distancias genéticas pareadas no corregidas entre poblaciones (D_p) en el software Mega v5.2 con 1000 replicas Bootstrap.

La reconstrucción filogenética mediante el método de agrupamiento Neighbor-Joining, fue realizada con el software Mega v5.2 bajo el modelo por distancias no corregidas con 1500 replicas Bootstrap y utilizando como grupo externo a *Allotoca zacapuensis*. Se utilizó este grupo externo ya que las distancias genéticas de dicha especie respecto del grupo de especies objeto de estudio son de $\overline{D_p}=2.5$ ($S_D=0.2\%$) siendo considerada como la especie más cercana en reconstrucciones filogenéticas anteriores en base a caracteres morfológicos y marcadores moleculares (Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004).

La inferencia filogenética por método bayesiano (IB) se obtuvo con el software MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), bajo el mismo modelo evolutivo de sustitución estimado para las secuencias y bajo 2 simulaciones a través de 3 millones de generaciones, 4 cadenas de Markov y muestreando cada 100 árboles y valores de Likelihood (-lnL) de los estimados. Se hizo un "Burnin" evaluado graficando los valores de -lnL contra el número de generaciones, descartando el 10% (3000) de las topologías muestreadas del total de inferencias reconstruidas, con el resto se obtuvo un árbol consenso con desviación estándar menor al $S_D=0.0002$. Se utilizó el valor de probabilidades posteriores bajo intervalos de confianza del 95% (Highest Posterior Density-HPD) para evaluar el soporte de los nodos.

Tabla 2. Modelos Evolutivos de Sustitución y Parámetros estimados para *Cytb* por el Criterio de Información AIC (Criterio de Información de Akaike).

Criterio	Posición	Modelo Evolutivo	InL	Modelo de Sustitución Tasa Ti/Tv	Frecuencia de Bases Nucleotídicas Empíricas	Parámetro: Forma de la distribución Gamma	Proporción de Sitios Invariables
AIC	Todo el fragmento	TIM+I+G	-1702.006	--	A=0.2476 C=0.2928 G=0.1349 T=0.3248	0.1490	0.9430

Nota: InL=Valor de Likelihood, Ti=Transiciones y Tv=Transversiones.

Finalmente, se realizó una inferencia a través del método de Máxima Verosimilitud con 1000 réplicas de Bootstrap. Para ello se utilizó el programa informático RAxMLGUI v1.3 (v7.3.2 Stamatakis, 2006; Silvestro y Michalak, 2012) con el modelo GTRGAMMAI (Generalized Time Reversible + Gamma + Proporción de Sitios Invariables) y 1000 réplicas de Bootstrap, y el mismo modelo para la estimación de árbol final (Stamatakis, 2006). En éste modelo se asume que cada sustitución nucleotídica, independientemente de si es una transición (cambio de purina por purina o pirimidina por pirimidina) o una transversión (cambio de purina por pirimidina y viceversa), tiene la misma tendencia relativa de ser sustituida por otra (tasa de intercambiabilidad) (Tavaré, 1986).

Estructura genética

Se estimó el nivel de estructura genética a través de las pruebas pareadas entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*, por el cálculo del índice de fijación (Φ_{st}). Para evaluar la significancia de la diferenciación genética entre las especies se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) con 10,000 permutaciones implementadas a través del software ARLEQUIN v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010). Se aplicó un ajuste de significancias por medio de la corrección secuencial de Bonferroni (Rise, 1989).

Demografía Histórica y Tiempos de Divergencia

La diversidad genética de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* se infirió por medio de la estima de la diversidad nucleotídica (π , Nei, 1987) y diversidad haplotípica (h , Nei, 1987), a través del software DNAsp v5.0 (Librado y Rozas, 2009). Además se estimaron otros parámetros de tipo demográfico: Prueba de Neutralidad (D_t , Tajima, 1993 y F_s de Fu, Fu y Li, 1993; 1997) a través del software ARLEQUIN v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010), para estimar si se ha experimentado expansión poblacional, cuellos de botella o heterogeneidad de tasas mutacionales a niveles específicos.

Para el análisis filogeográfico se utilizó el método Median-Joining; algoritmo que implementa distancias génicas a través de Máxima Parsimonia para caracteres multiestado, por medio del software Network v4.6.1.0 (Bandelt *et al.* 1999).

Los tiempos de divergencia entre las tres especies se estimaron a través de métodos de coalescencia con el software Beast v1.6.2 (Drummond y Rambaut, 2007) bajo el modelo de evolución nucleotídica estimado anteriormente y bajo el método de Bayesian Skyline Plot (BSP). Para ello se utilizó un reloj molecular relajado el cual permite estimar tiempos de divergencia cuando existen variaciones en la tasa de mutación dentro del grupo de estudio o bien, a lo largo de la topología.

La calibración a través de un fósil no fue posible, por lo que el reloj molecular fue calibrado con la tasa de mutación estimada para Teleosteos en primera instancia 0.76-2.2%/MA (3.8×10^{-9} - 1.1×10^{-8} Sust/Linaje/Sitio/Año) (Zardoya y Doadrio, 1999; Machordom y Doadrio, 2001; Perdices y Doadrio, 2001; Near y Benard, 2004).

Para dicho análisis se utilizaron 70,000,000 generaciones, muestreando cada 1000 topologías y valores de $-\ln L$. Se revisaron los valores posteriores de los prior en base a los Tamaños Efectivos de Muestra (ESS por sus siglas en inglés, ≥ 200) a través de Tracer v1.5 y se descartaron el 10% de las topologías para la reconstrucción del árbol consenso. Esto último se realizó tomando las topologías con valores de soporte mayores al 50% (Posterior Probability Limit=0.05) que posean límites de confianza mayor o igual al 95% (HPD \geq 95%). La estima del tamaño efectivo poblacional a través del tiempo se realizó por la obtención de la relación entre genealogías y la historia demográfica de las

secuencias (eventos coalescentes), donde intervalos pequeños de coalescencia se agrupan y se eligen el grupo de números óptimos mediante AIC. Dentro de estos intervalos de coalescencia se puede estimar el tamaño poblacional a través de BSP (Heled y Drummond, 2008). Para ello se utilizó la topología obtenida para la estima de tiempos de divergencia, en la que se realizaron tres grupos para permitir la estima del cambio del tamaño efectivo poblacional. Estos grupos están conformados por las secuencias génicas de las tres especies de estudio, incluyéndose el total de ellas (n=109) para maximizar la estima de eventos coalescentes dentro de límites de confianza (HPD \geq 95%) y reducir el sesgo por tamaño de muestra y diversidad genética. Un cuarto grupo fue elaborado, el cual anida a las tres especies (Ingroup) y permite la estima del tiempo de coalescencia genética con el ancestro común (Outgroup) de las tres especies.

La construcción de los BSPs se realizó con el Software Tracer v1.5 con 1000 iteraciones y 10 clases para cada grupo, no mostrando enmascaramiento de datos. Se utilizaron el total de topologías generadas anteriormente (70,000,000).

Se estimaron los eventos coalescentes y los modelos demográficos bajo inferencia Bayesiana con el software IMa2 (Hey y Nielsen, 2004, 2007, Hey 2010), con la ventaja de que implementa modelos de flujo génico (migración) entre poblaciones y por lo tanto maximiza las relaciones en eventos recientes. Es capaz de distinguir el flujo génico entre poblaciones ancestrales y su tamaño efectivo poblacional y además flujo génico posteriormente al evento de separación física entre las especies. Por lo que es de gran utilidad para reconocer procesos antes y después de los eventos coalescentes.

Proporcionar las relaciones genealógicas entre las especies es indispensable para este análisis. La genealogía contiene información del orden de los nodos internos en el tiempo. Estos nodos internos corresponden a poblaciones ancestrales. Por lo tanto, es necesario realizar el análisis bajo los distintos escenarios posibles lo que además resulta una prueba de hipótesis filogenética. Además, estas reconstrucciones ayudan a identificar modelos filogeográficos y filogenéticos para las especies.

Las especies se colocaron en cada nodo terminal indistintamente en los tres escenarios (Fig. 11).

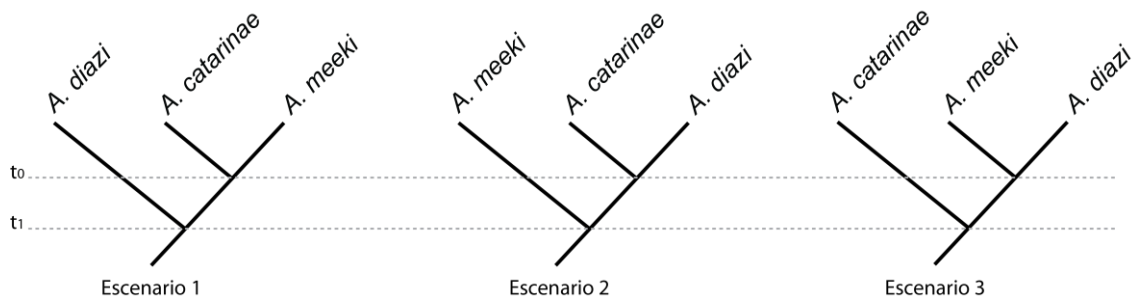


Figura 11. Topologías posibles para la estima de tiempos de divergencia, cambios en el tamaño efectivo poblacional y tasa de migración a través de Coalescencia. t_0 y t_1 representan los eventos de divergencia entre especies en el tiempo.

La tasa de mutación utilizada en este caso fue por locus por año ($3.94 \cdot 10^{-6}$ Sust/Locus/Año). Los parámetros de tamaño poblacional, tiempos de divergencia y tasa de migración que necesita el programa, fueron obtenidos a través de la media geométrica de la tasa de mutación por población ($4N\mu$) a través de θ_w (proporción de sitios segregativos por locus-Watterson's Estimator; Watterson, 1975), sin embargo, estos parámetros son irrelevantes cuando *Allotoca catarinae* tiene valores de diversidad genética iguales a cero. Por lo que se estimaron a través de los valores de θ_w para *A. diazi* y *A. meeki*. Se utilizó el total de secuencias a excepción del grupo externo dado que es una sola secuencia y puede introducir "ruido" al análisis. Se utilizó el modelo evolutivo de sustitución HKY (Hasegawa-Kishino-Yano; Hasegawa *et al.* 1985) porque es el que se recomienda para ADNmt en este análisis, el cual asume que las tasas de cambio de transición/transversión son independientes entre sí y por lo tanto pueden ser distintas, distribución desuniforme de los nucleótidos, e involucra reversibilidad de tiempo (los parámetros del modelo pueden cambiar a lo largo del árbol) (Gu y Li, 1996).

La duración del periodo "Burnin" fue de 5,000,000. Un número de pasos entre las topologías muestreadas de 10,000 y un total de 100,000 topologías muestreadas. Se utilizaron un total de 20 cadenas de Markov (Implementando el algoritmo Metropolis-Hastings). Se asumió que el tamaño efectivo poblacional es distinto en cada periodo de tiempo, una generación anual y un modelo de migración entre las especies internas en la topología. Este modelo de migración ayuda a estimar si existió flujo génico antes o posterior a la

separación de las especies y su dirección, lo que ayuda a interpretar en conjunto con otros análisis; procesos de recolonización o flujo génico reciente, hibridación, clasificación de linajes incompletos y tiempos de divergencia-separación física. La convergencia de las cadenas y los valores de ESS fueron revisados posteriormente.

9.2.2 Microsatélites

Diversidad Genética y Dinámica Poblacional

Se estimó el número de alelos por loci y por especie (N_a), número de alelos efectivos (N_{ae}), proporción de alelos nulos y desequilibrio de ligamiento a través de ARLEQUIN v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010), Genepop v4.1.2. (Rousset, 2008).

Para conocer si los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weiberg, se estimaron la heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e), endogamia por índice de fijación de Wright (F_{is} , Wright, 1951), por medio del programa ARLEQUIN v3.5.1.3 con un número de repeticiones de 1,000,000 por medio de cadenas de Markov y 100,000 permutaciones. Dado los valores de significancia de la desviación (HW) para cada uno de los loci, se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni.

Se realizó una prueba de significancia para determinar la presencia de un cuello de botella reciente a través del programa Bottleneck v1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1997). Esta prueba se realizó con 10,000 iteraciones y con un límite de confianza de 95% ($P < 0.05$). Se empleó la prueba "Mode-Shift" que utiliza la distribución de las frecuencias alélicas. Se espera que estén cerca del equilibrio mutación-deriva, aquellas poblaciones que no han experimentado un cuello de botella y por lo tanto, tenderían a tener más alelos de baja frecuencia (< 0.1) que alelos con frecuencias intermedias o mayores. Mientras que la proporción esperada de alelos de baja frecuencia variarán con la tasa de mutación y el modelo de mutación en un locus particular, siempre se espera que sean más abundantes que aquellos con frecuencia media (Nei *et al.* 1975). La prueba "Mode-Shift" detecta la distorsión en la distribución de las frecuencias alélicas causada en poblaciones que experimentan cuellos de botella recientes (Luikart *et al.* 1998).

La identificación de cuellos de botella se realizó en base a tres modelos de evolución molecular: (1) Modelo de Alelos Infinitos (IAM-Infinite Allele Model; Kimura y Crow, 1964), en el que cada mutación puede generar un alelo nuevo y cada alelo es considerado para ser completamente diferente de otro, se estima un exceso de heterocigosis por pérdida de variación en caso de cuello de botella (Maruyama y Fuerst, 1985); (2) Modelo con Dos Fases (TPM-Two-Phase Model; Di Rienzo *et al.* 1994), que asume que la mayoría de las mutaciones conllevan la ganancia o pérdida de una unidad de repetición, pero que también se pueden producir mutaciones de mayor tamaño con igual probabilidad y el (3) Modelo de Mutación Paso a Paso (SMM-Stepwise Mutation Model; Ohta y Kimura 1973), en el que el proceso de mutación añade o elimina una unidad en el alelo y se esperaría una deficiencia de heterocigosis en presencia de cuello de botella. Los valores de significancia se sometieron a Corrección de Bonferroni.

Estructura Genética

Se estimó el nivel de estructura genético a través de las pruebas pareadas entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*, por el cálculo del Índice de Fijación (F_{st} de Wright). Para evaluar la significancia de la diferenciación genética entre las especies se llevó a cabo un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) estimando los valores de los estadísticos F de Wright (Índices de fijación F_{st} , F_{is} y F_{it}). Un número de 10,000 permutaciones fueron implementadas a través del software ARLEQUIN v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010). Se aplicó un ajuste de significancias por medio de la corrección secuencial de Bonferroni (Rise, 1989).

También se estimó el patrón de estructura genética a través de inferencia Bayesiana. Para esto no se asignó *a priori* a los individuos dentro de poblaciones de origen o de especies. Fue necesario variar el número de grupos posibles del conjunto de datos para determinar el número de grupos que mejor explican la variación genética entre las especies ("Criterio ΔK "=K; Evanno *et al.* 2005) y la proporción de individuos asignados por cada agrupación. Los valores de K representan el número de poblaciones con mayor probabilidad de minimizar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg y Equilibrio de Ligamiento en cada grupo.

Por medio del software Structure v2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000), se realizaron corridas independientes asignando valores de $K=1$ hasta 10 poblaciones, asumiendo correlación de la frecuencia de alelos y bajo un modelo de mezcla (Admixture Model) (Pritchard *et al.* 2000; Hubisz *et al.* 2009); es decir, que la frecuencia alélica es similar entre las tres especies y que existió una posible unión entre los tres grupos en algún periodo de tiempo y por lo tanto, comparten parte de la variación genética total.

Para cada valor de K se utilizó el método de Monte Carlo por medio de cadenas de Markov (MCMC) con un periodo de 100,000 pasos y una longitud de cadena de 500,000. Se hicieron 10 corridas por cada K estimada para evaluar la tasa de variación entre valores adyacentes de K (al incrementar). La variación de los valores de Likelihood de cada corrida por K evaluada se utilizó para calcular ΔK , que permite identificar el valor de K que más se ajusta a los datos (Mayor $-\ln L$ y menor desviación estándar). Sin embargo, este método explica con el menor valor de K el mayor nivel de estructura genética en los datos, por lo que puede ser subestimada (Falush *et al.* 2007; Mezouk *et al.* 2011).

Para dar robustez al análisis de estructura genética a través de inferencia Bayesiana y a la estima del valor de K , se estimaron los valores del índice de fijación F_{st} entre el número de grupos en el valor de K que mejor explica la estructura genética por método de Evanno *et al.* (2005).

Se estimó el número de K máximo por medio del Criterio de Información de la Desviación (DIC por sus siglas en inglés), a través del software TESS v2.3 (Chen *et al.* 2007). El criterio DIC, es un modelo generalizado del AIC y del Criterio de Información Bayesiano (BIC), que a través de la estima de valores de Likelihood, se relaciona con la bondad de ajuste del modelo y que introduce una penalización debida a la mayor complejidad del modelo: Modelos con menor DIC son mejores, pues indican un mejor grado de ajuste y un menor grado de complejidad (Spielgelhalter *et al.* 2002). De este modo, es posible obtener modelos de estructura genética que más se ajusten a los datos y compararlos con el obtenido a través del método de Evanno *et al.* (2005). Para ello se realizaron 10 corridas para cada valor de K desde $K=2$ hasta 10, con una longitud de 50,000 pasos y un periodo "Burnin" de 10,000. Se utilizó el parámetro Admixture Model y bajo un método de agrupamiento bayesiano

(Modelo Bayesiano, BYM por sus siglas en inglés) (Durand *et al.* 2009). El modelo BYM permite reducir el número de grupos espurios dentro de K , dados cuando la variación es mayoritariamente clinal, mientras que es capaz de detectar zonas de pequeñas discontinuidades genéticas.

Se utilizó el número de individuos y las proporciones de asignación por grupo en base al K con mayor valor de $-\ln L$ (análisis con Structure v2.3.3) y menor valor de DIC (análisis con TESS v2.3) para observar el nivel de estructura genética. Este paso se realizó sumando las diez corridas dentro de K dado a través del software CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007) para ambos análisis. Se utilizaron 1000 repeticiones y se probaron todos los modelos posibles reteniendo el de mayor probabilidad con el algoritmo Greedy. La visualización de los gráficos de ambos análisis con el número de individuos *versus* su proporción de asignación a cada grupo genético fue construido por medio del software Distruct v1.1 (Rosenberg, 2004).

La comparación entre alelos de microsatélites puede proporcionar dos tipos de información: identidad/no identidad de alelo y diferencia en el tamaño de los alelos (Hardy *et al.* 2003). Sin embargo, la identidad alélica a la que se refiere en este caso es a la identidad de estado (dos copias de genes son iguales aunque provengan de poblaciones diferentes) y no de descendencia (dos copias de genes son iguales por que provienen de un ancestro común). El parámetro F_{st} describe el grado de diferenciación genética entre poblaciones y está definido como la correlación entre los estados alélicos y los genes muestreados dentro de las poblaciones. Esto es la probabilidad de que dos genes de diferentes poblaciones (y dentro de una misma población) son idénticos en estado (Wright, 1965; Excoffier, 2001). Bajo este parámetro se pueden asumir dos casos: (1) las especies se diferenciaron genéticamente por deriva genética sin flujo genético o (2) las especies se diferenciaron genéticamente a través de un balance entre la deriva genética y el flujo genético; por ejemplo donde una población aislada con tamaño efectivo poblacional recibe cada periodo de tiempo (o generación) una proporción de genes tomados al azar de otra población.

En el caso del parámetro F_{st} el tamaño de los alelos es irrelevante. Sin embargo, la diferencia de tamaños entre alelos puede proporcionar información importante para entender la tasa de mutación, migración y tiempos de

divergencia, y por lo tanto en la diferenciación genética. Por lo que es necesario identificar si la diferencia de tamaño entre alelos contribuye a la diferenciación genética entre *A. catarinae*, *A. diazi* y *A. meeki*. Para dicho propósito se estimaron los valores de R_{st} , parámetro análogo al F_{st} pero basado en diferencias entre alelos y no entre identidad de estados de alelos, que se define como la correlación entre los tamaños alélicos entre los genes muestreados dentro de las poblaciones. Una desviación significativa ($R_{st} > F_{st}$) asumiría que la diferencia entre tamaños alélicos contribuyen a la diferenciación genética y por lo tanto, la tasa de mutación es mayor a la tasa de migración posible. De manera opuesta, un equilibrio entre los valores de diferenciación genética ($R_{st} = F_{st}$) asumiría que no existe una contribución de las diferencias de tamaños entre alelos a la diferenciación genética entre las especies estudiadas en este trabajo, sugiriendo además que la tasa de mutación es menor a la de migración (Hardy *et al.* 2002).

La estima de los valores de R_{st} se realizó a través de software SPAGeDi v1.3a (Hardy y Vekemans; 2002). Para ello se obtuvo una prueba de significancia entre la diferencia de los valores observados de R_{st} y F_{st} de los esperados a través de un análisis de permutaciones de tamaños alélicos (R_{st}) y de individuos entre las poblaciones (F_{st}). Se implementaron 20,000 permutaciones por análisis sólo asignando los individuos a sus correspondientes poblaciones y sin información espacial.

Tamaño Efectivo Poblacional y Tiempos de Divergencia

Los tiempos de divergencia entre las especies, los eventos coalescentes génicos y los modelos demográficos para microsatélites, se estimaron bajo Inferencia Bayesiana con Modelo de Coalescencia, tomando en cuenta posible migración. Esto se realizó a través del software IMA2 (Hey y Nielsen, 2004; 2007, Hey, 2010).

La metodología utilizada para este análisis es la misma que se utilizó para estimar los tiempos de divergencia por medio de *Cytb*. Sin embargo se realizó el análisis en combinación con los datos de ADNmt porque ayuda a estabilizar y apoyar un intercambio de tasas de tiempos de divergencia (Promedio de cambios propuestos aceptados por el criterio de Metropolis-Hastings) entre las

cadena (Nielsen y Wakeley, 2001; Rannala y Yand, 2003). Entre mayor es el número de datos (>2 poblaciones), mayor es el número de variación y el número de cadenas necesarias para lograr un intercambio de tasas. Este intercambio es necesario, pues ayuda a reducir la desviación estándar de las inferencias y generar límites de confianza más “fiables” (Hey y Nielsen, 2004; 2007; Hey, 2010).

La tasa de mutación por locus, por gameto y por generación fue de $1.2 \cdot 10^{-4}$ Locus/Gameto/Generación; tasa estimada para 2000 microsatélites en Pez Cebra (*Danio rerio*) (Shimoda *et al.* 1999), que además es congruente con la estimada en otros vertebrados (Weber y Wong, 1993; Crawford y Cuthbertson, 1996; Yue y Orban, 2007). El modelo evolutivo utilizado fue SMM pues es el recomendado para este análisis (Hey, 2010), además de que se observó a través del análisis de R_{st} , que la variación de microsatélites utilizados en este trabajo y entre estas especies no está dado por longitud de los alelos, sino por la relación de heterocigotos observados con los esperados.

La tasa para *Cytb* fue la misma que en el análisis independiente (Sust/Locus/Año). Se utilizó el mismo modelo evolutivo de sustitución que se estimó de manera independiente.

Se realizaron 10 corridas independientes por escenario en las que la duración del periodo “Burnin” fue de 500,000 en cada una (5,000,000 en total). Un número de pasos de 10,000 entre las topologías muestreadas, ese mismo número de topologías se recuperaron por corrida para completar un total de 100,000 topologías al término de las 10 corridas. Se utilizaron en total 150 cadenas de Markov. Se asumió que el tamaño efectivo poblacional y la tasa de migración es distinta en cada periodo de tiempo, que hay una generación al menos por año y un modelo de migración entre las especies. Los valores de ESS fueron revisados al mismo tiempo que la convergencia de las cadenas por cada corrida. Las corridas fueron unidas sumando las 100,000 genealogías generadas en las 10 corridas de cada escenario.

9.2.3 Predicciones de Nicho Ecológico en el Pasado.

Los modelos de Nicho Ecológico son importantes para una variedad de aplicaciones en ecología y conservación en casi todo tipo de organismos incluyendo peces (Graham *et al.* 2004). Tiene aplicaciones en el estudio de

riqueza de especies y su distribución, distribución potencial de comunidades, de hábitats amenazados, de especies en el pasado incluyendo la identificación de refugios en el pasado, riesgo asociado a especies invasoras, protección y conservación de especies amenazadas, efectos del cambio climático, patrones de diversidad, el diseño de reservas, delimitación de regiones biogeográficas, identificación de localidades con especies nuevas o raras, delimitación de lugares para futuros trabajos de campo, repoblación, localización de corredores óptimos para la distribución de especies, contraste de hipótesis evolutivas, efectos de la actividad humana en la distribución de especies, taxonomía y la distribución potencial de enfermedades infecciosas (Mateo *et al.* 2011). Estos modelos son por tanto representaciones cartográficas de la idoneidad de un espacio para la presencia de una especie en función de las variables empleadas para generar dicha representación. La idoneidad no es más que la relación matemática o estadística entre la distribución real conocida y un conjunto de variables independientes que se usan como indicadores (Guisan y Zimmermann, 2000). En el presente trabajo se utilizaron variables climáticas, donde se esperaría que con algunas de ellas, individualmente o en combinación, se puedan definir las áreas de distribución potencial a raíz de factores ambientales que delimitan las condiciones favorables para la presencia de las tres especies en el pasado y el futuro.

Los modelos para distintos periodos de tiempo en el pasado permite identificar sitios que poseían las características adecuadas en la que una población o especies pudo habitar o dispersarse, así como el impacto del cambio climático en esos procesos y los patrones espaciales de diversidad de especies (Graham *et al.* 2006), lo cual es importante para el presente trabajo puesto que puede reforzar o ayudar a entender las inferencias generada en esta investigación.

Ya que no se tienen identificados los eventos geológicos que se comparten en espacio y tiempo para la separación entre *Allotoca catarinae*, *A. diazi* y *A. meeki*, y debido a la baja divergencia genética entre especies, existe la posibilidad de que dicha separación se produjera en tiempos geológicos recientes, por lo que la información paleoclimática podría ser una herramienta poderosa que podría ayudar a esclarecer la historia evolutiva de las especies bajo estudio. De esta forma, la predicción de áreas históricas de distribución similares entre especies en un mismo periodo de tiempo, sugerirían la

inexistencia de barreras ambientales. Las barreras climáticas podrían estar asociadas a barreras geográficas y su inexistencia permitiría probablemente la conexión de las poblaciones hasta ese punto o al menos durante ese periodo. Esta área tendría el potencial para ser habitada por la especie en cuestión y permitiría reconstruir el rango de distribución ancestral probable. Mientras que en la predicción de áreas de distribución ancestrales diferentes en un mismo periodo de tiempo entre dos o más regiones por especie, hablarían de la aparición de una barrera climática antes o durante ese periodo. Sin embargo, en el último caso es posible que en fracciones del área de distribución antigua de una especie se traslape con la de otra reconstruyendo el rango de distribución ancestral probable o corredores potenciales de distribución. En ambos casos, los puntos de solapamiento entre áreas de distribución de cada especie reflejaría posibles conexiones físicas en el pasado o regiones con condiciones idóneas para su colonización; mientras que la ausencia de solapamiento, las posibles barreras climáticas que se han formado a lo largo del tiempo asociadas a eventos geológicos. Para ello sería necesario comparar al menos dos periodos de tiempo. Dado esto, se esperaría que existiera congruencia de la similitud/diferencias de áreas de distribución hacia el pasado con la información geológica, topográfica y los tiempos de divergencia genéticos entre las especies.

Se realizaron predicciones también hacia el futuro a través de condiciones climáticas. Las predicciones de nicho ecológico para el futuro permiten generar información importante para el desarrollo de programas de conservación tanto de áreas geográficas como de su biota.

Se utilizó la técnica discriminante que utiliza los datos de presencia y ausencia para construir un modelo clasificador. En este caso se utilizó el método de Máxima Entropía con el software Maxent v3.3.3 (Philips *et al.* 2006; Philips & Dudík, 2008). Maxent genera sus propias ausencias, por lo que no es necesario introducir datos de ausencia en el software.

Las variables bioclimáticas son derivadas de la temperatura y precipitación mensual, lo que permite darles un sentido biológico a estas variables. Se utilizaron 19 variables basadas en reconstrucciones paleoclimáticas de tres periodos diferentes en el tiempo hacia el pasado (Tabla 3): Periodo interglaciar de hace ~120-140,000 años (Otto-Bliesner *et al.* 2006), el último máximo

glaciar hace ~21,000 (Otto-Bliesner *et al.* 2006a) y un periodo de 50 años desde 1950-2000 (Hijmans *et al.* 2005). Fueron utilizados de igual manera las 19 variables para 3 periodos en el futuro: el año ~2020, el ~2050 y el 2080 utilizando la reducción de escala NCAR-CCSM0.3 (Ramírez y Jarvis, 2008), ya que los parámetros que toma en cuenta se encuentran en la media del resto de modelos. Se consideraron estos periodos por el cambio de condiciones que hay entre uno y otro, principalmente de temperatura y precipitación.

Tabla 3. Variables Climáticas utilizadas para el modelo de Nicho Ecológico en el Pasado.

No.	Variable Climática
1	Media de Temperatura Anual
2	Oscilación Diurna de Temperatura
3	Isotermalidad (Cociente entre variables 2 y 7)
4	Estacionalidad de la Temperatura (Desviación Estándar en %)
5	Temperatura Media Máxima del Mes Más Cálido
6	Temperatura Media Máxima del Mes Más Frío
7	Oscilación de la Temperatura Anual
8	Temperatura Media del Cuatrimestre Más Lluvioso
9	Temperatura Media del Cuatrimestre Más Seco
10	Temperatura Media del Cuatrimestre Más Cálido
11	Temperatura Media del Cuatrimestre Más Frío
12	Precipitación Anual
13	Precipitación del Mes Más Lluvioso
14	Precipitación del Mes Más Seco
15	Estacionalidad de la Precipitación (Coeficiente de Variación)
16	Precipitación del Cuatrimestre Más Lluvioso
17	Precipitación del Cuatrimestre Más Seco
18	Precipitación del Cuatrimestre Más Cálido
19	Precipitación del Cuatrimestre Más Frío

Las predicciones se realizaron utilizando los puntos de muestreo y las localidades donde se han registrado la presencia de cada una de las especies. El número de individuos utilizados fue el mismo que el usado en el análisis genético. También se realizaron con sólo un registro por localidad, sin embargo no varió la predicción. Demostrando que la fuente de variación esta en la localización y no en número de individuos en la misma.

Los puntos de muestreo se clasificaron en modelos para cada una de las especies y en cada periodo. Se analizaron por separado utilizando un total de 5,000 iteraciones por proceso con 100 réplicas Bootstrap para generar los

intervalos de confianza del 95%. A cada análisis por especie y por periodo se les asignó varios valores de “multiplicador de regularización” (Regularization Multiplier: RM), parámetro que influye en el nivel de enfoque o cuán cercanamente se ajusta la distribución de salida obtenida. Un valor menor que el valor por defecto (RM=1) producirá una distribución más localizada que se ajustan estrechamente a los registros de presencia dados. Un valor mayor producirá una distribución potencial más extendida. Los valores asignados fueron de RM=0.01-1. Cada análisis con dicho valor de RM fue evaluado a través de los valores de AUC (Área debajo de la curva ROC o Receiver Operating Characteristic; por sus siglas en inglés). Valores de AUC=0.5 significa que el modelo no tiene valor discriminante (equivalente a una clasificación al azar). Valores de AUC=1 el modelo ha separado presencias de ausencias con un ajuste perfecto. En otras palabras, bajos valores de AUC hablarían de que la distribución potencial predicha es explicada parcialmente por las variables utilizadas y por lo tanto el modelo es deficiente y poco robusto, mientras que con valores altos o de 1 se esperaría que la distribución potencial predicha se explica muy bien a partir de variables climáticas. Sin embargo, los modelos pueden dar idénticos valores de AUC para la misma especie y el mismo periodo, pero con distinto valor de RM. Por lo que en estos casos los modelos fueron evaluados a través de la menor tasa de omisión que cada modelo proporcione, la cual es el porcentaje de predicciones verdaderas no detectadas en un modelo siendo utilizadas las predicciones falsas o falsos negativos.

9.2.4 Predicciones de Nicho Ecológico en el Futuro e Identificación de Unidades de Conservación.

Para la identificación de las unidades de conservación se incorporó tanto la información genética, biológica y ecológica obtenida de la presente investigación, así como la información relevante obtenida de la bibliografía siguiendo lo expuesto en Doadrio *et al.* (1996), Crandall *et al.* (2000), Moritz (2002) y Domínguez-Domínguez *et al.* (2007).

El concepto de unidad de conservación utilizado en este estudio es el llamado OCU (Unidad Operacional de Conservación) (Doadrio *et al.* 1996). Definido como un área continua limitada por barreras geográficas bien definidas y

habitada por una o más poblaciones que comparten el mismo patrón genético. Asume entonces que la conservación como unidad, puede garantizar su viabilidad de las poblaciones o población que se consideren dentro.

La identificación y establecimiento de un OCU puede realizarse en base a la variabilidad genética, diferenciación y estatus de conservación actual. Por lo tanto, en el presente trabajo se establecerán las OCUs pertinentes en base a la información biogeográfica, genética y ambiental recabada. Sin Embargo es necesario incluir criterios sociales y políticos para reforzar o rechazar dicha determinación.

Con la idea de proporcionar información adicional en torno a la conservación de las especies estudiadas y dar información a futuro en relación a las OCU's seleccionadas, se realizaron predicciones de nicho hacia el futuro a través de condiciones climáticas. Las predicciones de nicho ecológico para el futuro permiten generar información importante para el desarrollo de programas de conservación tanto de áreas geográficas como de su biota.

La metodología y variables utilizadas son las mismas que ya fueron explicadas para las predicciones en el pasado. En este caso se eligieron 3 periodos en el futuro: el año ~2020, el ~2050 y el 2080 utilizando la reducción de escala NCAR-CCSM0.3 (Ramírez y Jarvis, 2008), ya que los parámetros que toma en cuenta se encuentran en la media del resto de modelos. Se consideraron estos periodos por el cambio de condiciones que hay entre uno y otro, principalmente de temperatura y precipitación.

Se utilizó el escenario futuro A1B del panel intergubernamental en cambio climático-reporte especial en escenarios de emisiones (IPCC-SRES por sus siglas en inglés). Los escenarios del IPCC-SRES en primera instancia fueron contruidos para explorar el futuro desarrollo del entorno global, con especial referencia a la producción de gases de efecto invernadero y las emisiones de precursores de aerosoles. Estos escenarios contienen varias fuerzas motrices que podrían influir en las emisiones de gases de efecto invernadero, sistema de energía, cambio de uso de suelo, etc. Siendo una de las fuentes más tomadas en cuenta el crecimiento poblacional y el desarrollo socioeconómico. Sin embargo, la evolución de las fuerzas que impulsan el cambio climático subyacente son inciertas. Esto da lugar a una gama muy amplia de posibles trayectorias de las emisiones de gases de efecto invernadero. En sí, los

escenarios futuros describen las relaciones entre las fuerzas motrices de la emisión de gases de efecto invernadero y las emisiones de aerosol y su evolución durante el siglo XXI para largas regiones del mundo o globalmente, representando diferentes grados de desarrollo demográfico, socioeconómico, tecnológico y ambiental.

Los escenarios de la familia “A” se enfatizan en el desarrollo económico, social y cultural, dejando de lado las cuestiones del medio ambiente. Mientras que los escenarios de la familia “B” están enfocados en el balance entre manejo y conservación de los recursos naturales y el desarrollo económico y sociocultural. Existe una combinación entre ambas familias, teniendo como resultado varios escenarios más. Los escenarios proveen los suficientes contrastes entre ellos para generar importantes criterios y vías para la conservación de las tres especies.

El escenario A1B futuro enfatiza en la riqueza humana globalizada. Describe un desarrollo económico rápido, un crecimiento poblacional con un pico hasta medio siglo y que declina en la segunda mitad, y la introducción rápida de nueva y más eficiente tecnología. Subraya la convergencia económica regional, la capacidad de desarrollo y el aumento de las interacciones culturales y sociales, con una reducción sustancial en las diferencias regionales en los ingresos per cápita y un balance entre la disponibilidad y el uso de combustibles fósiles y otros recursos energéticos (Ramírez y Jarvis, 2008a). Se utilizó sólo este escenario puesto que es una combinación de ambas familias y si se utilizaran todos los escenarios sería difícil de construir una interpretación biológica.

X. Resultados

10.1 Muestreo

10.1.2 Secuenciación y Alineamiento *Cytb*.

Se obtuvieron un total de 109 secuencias para las tres especies. Siendo 52 secuencias de cuatro poblaciones de *Allotoca catarinae*: Presa Santa Catarina (13), Parque Urbano Ecológico (15), El Sauco (11) y Presa Cupatitzio (13); 35 secuencias de una población de *A. diazi* (Manantial Chapultepec) y 22 secuencias de *A. meeki* de su única población en Opopeo. Las secuencias fueron alineadas manualmente por medio de Mega 5.2 y se corroboró la congruencia de las bases por medio de los cromatogramas, para descartar que la variabilidad se deba a artefactos del proceso de secuenciación.

10.1.3 Obtención de Microsatélites.

Se genotiparon los 96 organismos para los 7 microsatélites polimórficos, que corresponden al 88% de organismo obtenidos para *Cytb* (n=109). Se obtuvieron 42 genotipos (2N) de *Allotoca catarinae*: Presa Santa Catarina (9), Parque Urbano Ecológico (15), El Sauco (9) y Presa Cupatitzio (9); 37 genotipos de *A. diazi* de la población del Manantial Chapultepec y 22 genotipos de *A. meeki* de su única población en Opopeo.

El análisis de los fragmentos genotipados se realizó mediante el software GeneMapper v4® y Peak Scanner v1 Applied Biosystem, con el cual se pudieron caracterizar los alelos pertenecientes para los 96 individuos de las 3 especies antes mencionadas (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización de 20 loci de Microsatélites en *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.
 T_a=Temperatura de alineamiento. ND=No designado como alelo por posible inespecificidad.

Locus	Posible Repetición	Secuencia del Primer	T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	Tamaño de alelos aprox.
ZT1.2	(GT) ₁₄	F GTGCAGGCATGAGTTGTCTC R GTCTGTGAACACACAGTCA	60	3	266
ZT1.3	(GT) ₂₉ (GGAG) ₆	F GTTCCATCTGATAGGCTTCA R CTGTAGGTGCTACAGCTATA	43	1.5	318
ZT1.6	(TG) ₂₁	F GCACCTCCTAATACCTCACA R AAGCAGCAGTACTGTGAGCT	60	3	240-306
ZT1.7	(GGAT) ₁₂	F TTGCTATATTGTGCTAGTCT R ACTGAAATACTGTTTGTGT	52	1.5	130-250
ZT1.9	(GGAT) ₃₀	F CTGATGGTTTGAATCTATGC R TGAAGAAGCTGTCTGAGAGG	60	3	392-487
ZT1.12	(GT) ₈	F AGAACGATACAGAGTCAGT R GAGTTATGCTACTATCAGC	56	1.5	247
ZT1.25	(GT) ₂₁	F CCACTGCTACATCT R CTAGGACACTTCAA	49	3	ND
ZT1.29	(TG) ₅ AAT(GA) ₄	F AACACTGTTATCTGTGGAGG R ATACAGGACAGTGGTGCAAG	52	1.5	ND
ZT1.43	(TG) ₄₀ (AG) ₄ TG (AG) ₄	F GCTGTGGTTATGGGTTTATC R GCAGACATCCCTCAGTATGT	56	1.5	150-230
XC18	(CA) ₁₄	F AGGTCATCCGGAGAAAGGT R TTTCACAATCAAACCCCATGT	60	2.25	519-625
XC25	(AC) ₁₆	F CCTATTTGGGCTCCTGCTG R CTTTCTCCGTCCGGACTCT	60	3	178-196
AS2	(AC) ₁₀ G(CA) ₂₂	F CGAAAGCTGTTGTCTCCT R TTGTGATGCAAAGCAGTCGT	60	1.5	220-275
AS4	(AC) ₈	F GCAACAGAGGAGAGAGCGT R TGCTGTTGTCTCTGTTCTGTTG	60	1.5	ND
AS5	(GT) ₁₆	F GACTGCCACAAGTTACCTTCAC R TTCCAGACTCTGCCAACCT	60	1.5	200
CA6	(CA) ₇ CT(CA) ₃	F GAAAGGTCGCTAGTCCATCACA R GTGTGGGTTTTCTCCGTGT	52	3	ND
CA8	(CA) ₁₀ GA(CA) ₇ TA(CA) ₁₆	F CACTCACTGAACTACATACTCG R GTAACCTGTGTTTGTATGACCTT	50	3	ND
CA10	(CA) ₆ GA(CA) ₃₂	F GTCTATTGGCGTCAGCACAGTT R TTGGGTACATCGTGTTCGTTCT	52	1.5	ND
CA12	(CA) ₉ CC(CA) ₃₂	F CGGCTCTACTGAACCAAAATC R CTGAACTCCCTCCATCCA	49	3	ND
IW193	(CA) ₁₀	F CGGCATCAGTTCCTTTAA R CGAGGAAGAGGATGGAGATG	52	1.5	ND
IW196	(CA) ₁₃	F GGGGAGACAGCAAATGAGAA R TATAGCGGGCTTTTCACAC	60	1.5	197-251

10.2 Análisis

10.2.1 Cytb.

Diferencia entre Secuencias e Inferencia Filogenética

Las distancias genéticas medias de *Allotoca catarinae* fueron de $\overline{D_p}=0.6\%$ ($S_D=0.2\%$) con respecto a las otras dos especies. *Allotoca diazi* y *A. meeki* tienen una divergencia de $\overline{D_p}=0.3\%$ ($S_D=0.1\%$) (Tabla 5).

Las topologías de las tres inferencias de reconstrucción filogenéticas resultaron congruentes entre sí. Los valores de Bootstrap fueron poco diferenciales con las probabilidades posteriores (HPD \geq 95%) dados por el método bayesiano y con un adecuado soporte de ramas (>90 en niveles interespecíficos en al menos un método). Las relaciones y estructura del árbol fue la misma al utilizar el total de las secuencias y utilizando sólo los haplotipos encontrados ($h=9$; Tabla 8)). La topología está conformada por dos grupos muy cercanos o haplogrupos. Uno agrupa a *Allotoca diazi* ($h=5$ $n=35$) y *A. meeki* ($h=3$ y $n=22$) y por lo tanto, no se recobran con una monofilia recíproca. En el otro grupo donde sólo se encuentra la totalidad de las secuencias de *A. catarinae*, con un haplotipo ($h=1$ y $n=52$) (Fig. 12).

Tabla 5. Distancias genéticas pareadas absolutas D_p no corregidas (Bajo Diagonal) y su error estándar (Sobre la Diagonal) a partir de Cytb para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

	<i>A. diazi</i>	<i>A. meeki</i>	<i>A. catarinae</i>
<i>A. diazi</i>	--	0.1	0.2
<i>A. meeki</i>	0.3	--	0.2
<i>A. catarinae</i>	0.6	0.6	--

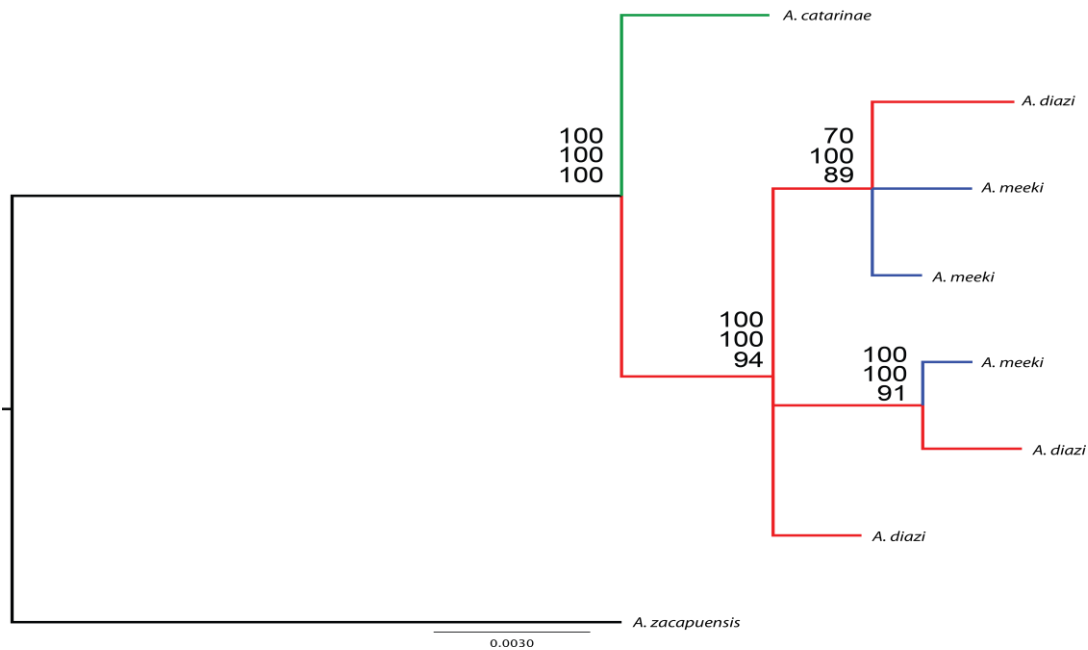


Figura 12. Inferencia Filogenética de las especies *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* con el gen mitocondrial *Cytb*. Los números representan los valores de Probabilidades Posteriores por Inferencia Bayesiana, Valores de Bootstrap para Máxima Verosimilitud y Neighbor-Joining en orden descendente.

Estructura Genética

La mayor variación fue explicada por el componente de variación entre grupos (especies) ($\Phi_{st}=0.82$ $P<0.05$) (Tabla 6). La variación dentro de las poblaciones explica un 17.55% de la variación total. Los valores de Φ_{st} fueron altos al comparar *Allotoca catarinae* respecto de *A. diazi* y *A. meeki*, encontrando un nivel de diferenciación debido a deriva genérica de $\Phi_{st}=0.840$ y $\Phi_{st} =0.960$, respectivamente (Tabla 7). Dichos valores fueron significativamente diferentes de cero y soportado por el bajo número de migrantes con respecto a *A. diazi* ($N_m=0.095$) y *A. meeki* ($N_m=0.020$). *Allotoca diazi* tiene un valor de diferenciación de $\Phi_{st}=0.350$ y significativamente diferente de cero ($P<0.05$), con un número de migrantes mayor que en la relación *A. catarinae*-*A. diazi/meeki* ($N_m =0.926$). Sin embargo los valores de N_m son bajos, lo que indica que las especies se encuentran aisladas de flujo génico entre sí, en cuanto al gen *Cytb* respecta.

Tabla 6. Estructura genética a través de análisis de varianza molecular (AMOVA) para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

Grupos	Φ_{st}	%Entre Grupos	%Dentro de los Grupos	P
<i>A. diazi</i> <i>A. meeki</i> <i>A. catarinae</i>	0.916	85.45	17.55	<0.05

Tabla 7. Diferenciación genética estimada para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

	<i>A. diazi</i>	<i>A. meeki</i>	<i>A. catarinae</i>
<i>A. diazi</i>	--	0.926	0.095
<i>A. meeki</i>	0.350*	--	0.020
<i>A. catarinae</i>	0.840*	0.960*	--

Nota: Valores de Φ_{st} pareados (Bajo la Diagonal) y Número de Migrantes (N_m ; Sobre la Diagonal). * Valor de significancia $P < 0.05$ después de la Corrección de Bonferroni.

Demografía Histórica y Tiempos de Divergencia

La diversidad nucleotídica es baja en las poblaciones evaluadas de *Allotoca diazi* ($\pi=0.003$) y *A. meeki* ($\pi=0.0007$), mientras que para *A. catarinae* es nula. La diversidad haplotípica en *A. diazi* y *A. meeki* es moderadamente alta ($h=0.78$ en $n=35$), en *A. meeki* es menor pero se mantiene moderadamente alta ($h=0.52$ en $n=22$). Mientras que en *A. catarinae* es nula, mostrando la existencia de un solo haplotipo; a pesar de que se analizaron cuatro poblaciones y un mayor número de individuos ($n=52$).

Allotoca diazi posee cinco haplotipos en una sola localidad (Manantial Chapultepec), de los cuales comparte dos con *A. meeki*. Ésta última tiene tres haplotipo de los cuales sólo uno es único para la misma. *Allotoca catarinae* posee un único haplotipo a lo largo de su rango de distribución y no es compartido con ninguna de las otras dos especies.

En el análisis filogeográfico se pueden observar los posibles haplotipos ancestrales extintos o secuencias no muestreadas (Median Vectors=Intersectos). Además, permite observar las relaciones entre los haplotipos (haplotipos compartidos-únicos) antes descrita, la frecuencia de cada haplotipo y su correlación espacial.

No es posible identificar haplogrupos entre *Allotoca diazi* y *A. meeki* y por lo tanto, no existe congruencia espacial para los haplotipos de *A. diazi* y *A. meeki*, dado que se encuentran mezclados entre sí y dadas sus distancias genéticas

tan reducidas (\overline{Dp} 0.3%, $S_D=0.1\%$). Sin embargo, *A. catarinae* conforma un haplogrupo que posee 4 pasos mutacionales con respecto a los haplotipos de *A. diazi* y *A. meeki* más próximos (Fig. 13). Dentro del haplogrupo de *A. diazi*-*A. meeki* hay un máximo de 3 pasos mutacionales entre haplotipos y un mínimo de 1 paso mutacional.

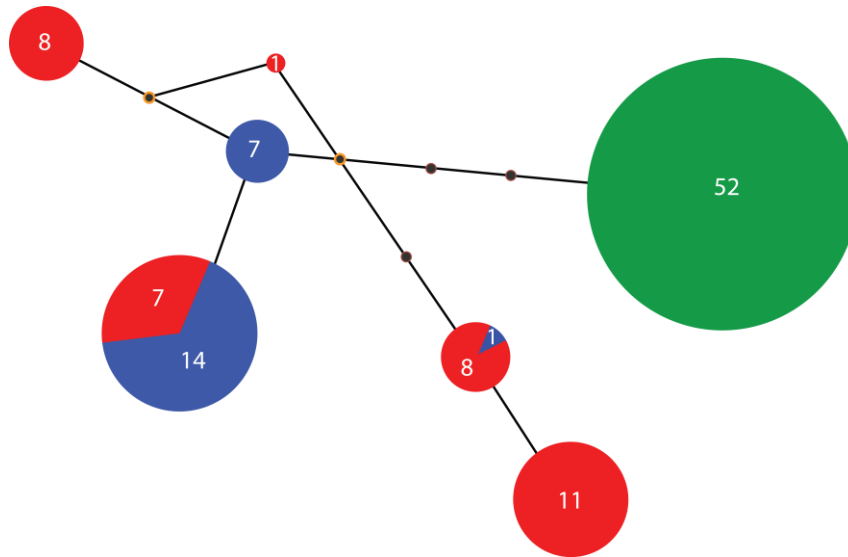


Figura 13. Red de Haplotipos para $\color{red}{\blacklozenge}$ *Allotoca diazi* (n=35), $\color{blue}{\blacklozenge}$ *A. meeki* (n=22) y $\color{green}{\blacklozenge}$ *A. catarinae* (n=52). Los valores en la figura representan las frecuencias de cada haplotipo. Los círculos con circunferencia naranja representan los Median-Vectors.

La prueba de neutralidad por medio de los estadísticos D_t de Tajima (1989) y F_s de Fu y Li (1993; 1997) fueron no significativo para la desviación de la hipótesis nula que asume neutralidad en el marcador para *Allotoca diazi* y *A. meeki* (Tabla 8). El estadístico D_t fue positivo para *A. diazi* ($D_t=1.61$). *Allotoca meeki* presenta un valor estimado de $D_t=-0.86$. El estadístico F_s fue positivo en ambos casos ($F_s=2.07$ y $F_s=0.69$ respectivamente).

Tabla 8. Diversidad genética de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* y Prueba de Neutralidad.

Especie	n	Hn	Poblaciones	π	h	Θ_s	Θ_l	F_s	Fu Li	D_t
<i>A. diazi</i>	35	5	1	0.0030	0.78	0.0016	1.70	2.07	ns	1.61ns
<i>A. meeki</i>	22	3	1	0.0007	0.52	0.0010	1.10	0.69	ns	-0.87ns
<i>A. catarinae</i>	52	1	4	0	0	0	0	-	-	-

Nota: n=tamaño de muestra, Hn=número de haplotipos, π =Diversidad Nucleotídica, h=Diversidad Haplotípica, Θ_s =Número de Sitios Segregativos por sitio Θ_l =Número de Sitios Segregativos por Locus y Ns=No Significativo para las Pruebas de Neutralidad.

El tiempo estimado para el ancestro común más reciente (TMRCA) de las tres especies está entre los 0.14MA y 0.90MA (HPD \geq 95%) (Fig. 15), el cual es el tiempo de divergencia genético estimado respecto de su ancestro común *A. zacapuensis*. El tiempo de divergencia estimado para *A. catarinae* respecto de *A. diazi* y *A. meeki* fue entre 0.0048MA y 0.21MA (HPD \geq 95%), mientras que la posible separación física de las tres especies pudo ocurrir entre los 0.140MA y los 0.890MA (HPD \geq 95). Sin embargo, *A. diazi* y *A. meeki* no muestran un patrón claro de divergencia genética puesto que se encuentran mezcladas ambas especies dentro de un mismo grupo genético. El tiempo de coalescencia genético para *A. diazi* (0.065-0.490MA) y *A. meeki* (0.060-0.470MA) ocurre posiblemente en el mismo periodo de tiempo, sin embargo este no es posible de observar sin un análisis independiente.

El tamaño efectivo poblacional a través del tiempo (HPD95%) para *A. diazi* es constante dentro del periodo de coalescencia 0.065-0.490MA. De igual manera se comporta el tamaño efectivo poblacional de *A. meeki* (0.060MA-0.470MA). *Allotoca catarinae* muestra una reducción poblacional en los últimos 50mil años (HPD \geq 95%) que puede estar asociada a la diversidad genética nula observada a partir de *Cytb* (Fig. 14).

La distribución de las densidades marginales fue bimodal sin tomar en cuenta el grupo externo. Los eventos de coalescencia para *Cytb* entre *A. diazi* y *A. meeki* se sobrelapan, mientras que en *A. catarinae* se observa una rama larga, lo cual se atribuye a la dificultad de encontrar un evento coalescente respecto a *A. diazi* y *A. meeki*.

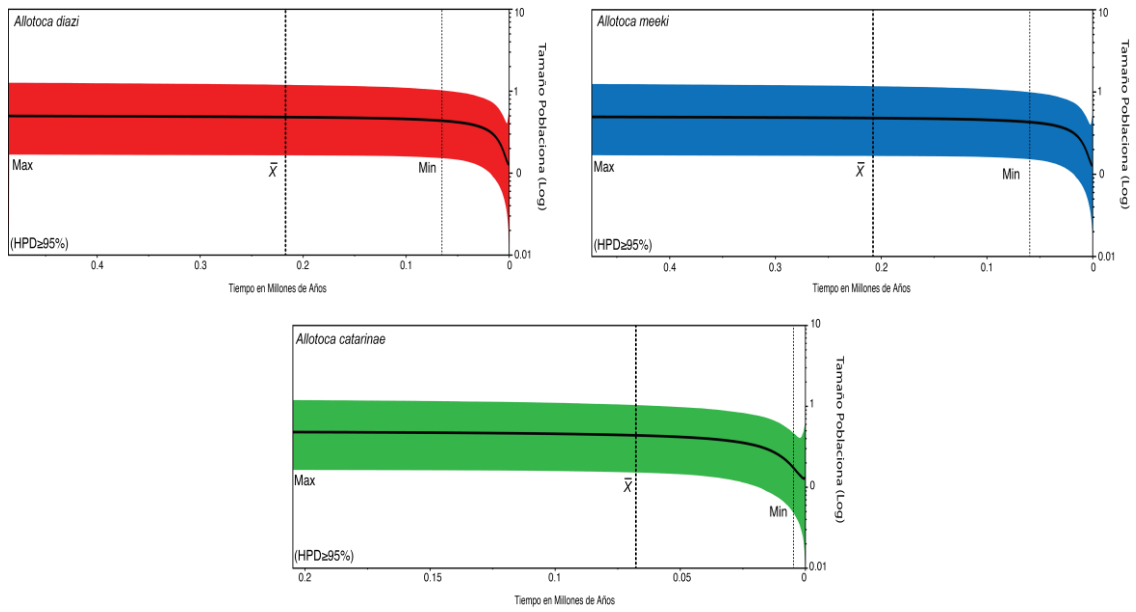


Figura 14. Cambio en el tamaño efectivo poblacional para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través del método BSP. Se pueden identificar los valores Mínimos (MIN), Máximos (Max) y la Media (\bar{X}) de los límites de confianza (HPD \geq 95%) donde se estima el TMRCA.

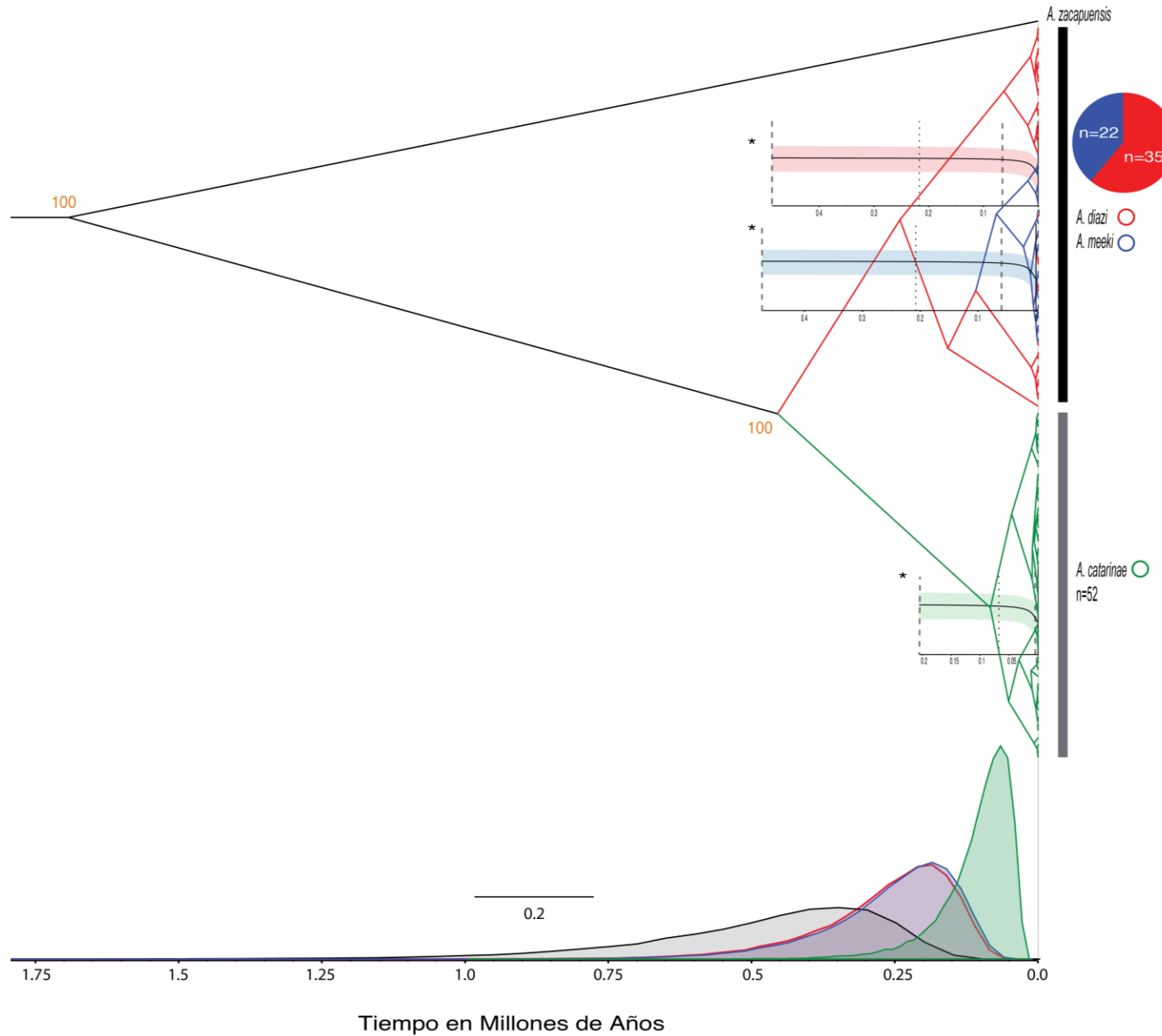


Figura 15. Modelo Coalescente de *Cytb* para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través de BSP. Se observa sobrelapado la topología consenso, la distribución de los TMRCA y los tamaños efectivos poblacionales a través del tiempo (*) para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*. Las líneas punteadas representan los límites de confianza (HPD \geq 95%) donde se encuentra el TMRCA. Las curvas representan las densidades marginales para el TMRCA estimado para cada especie incluyendo *A. zacapuensis* (gris).

La estima de tiempos de divergencia a través de IMA2 en los tres escenarios (Fig. 16) mostró que la posible separación entre las tres especies ocurrió muy recientemente, en los últimos 0.5MA (HPD \geq 95%), tiempo que se encuentra dentro de los rangos estimados a través del software Beast v1.6.2. El tiempo de divergencia entre *A. diazi* y *A. meeki* fue entre 0.0-0.42MA (Tabla 9). Sin embargo, no se observa un pico bien definido, lo que puede indicar que aún no divergen genéticamente. El tiempo mínimo de divergencia estimado para estas últimas dos especies, es menor al tiempo en el que se estima el evento coalescente genético a través de Beast v1.6.2. Por otro lado, se estimó un tiempo de divergencia de *A. catarinae* respecto de *A. diazi* de 0.044-0.46MA, mientras que la divergencia respecto de *A. meeki* se estimó entre 0.029-0.46MA, rango más amplio del estimado a través de Beast v1.6.

El estimado del número de migrantes por generación se muestra en la figura 16 (Centro) y Tabla 9. La tasa de migración estimada entre *A. diazi* y *A. meeki* fue de $2N_m=0.3-1.9/\text{Generación}$ (HPD \geq 95%). El modelo de migración se ajustó significativamente al periodo posterior a la separación entre ambas especies, sin embargo el número de migrantes por generación no fue significativo. También se ajustó el modelo de migración significativamente en los escenarios en los que *A. diazi* y *A. meeki* eran los grupos basales, lo que sugiere un flujo génico considerable ($2N_m=0.4-1.8/\text{Generación}$) antes de su separación y por lo tanto una conexión entre los hábitats, aunque este flujo no sea significativo a través de la información de *Cytb*. La tasa de migración estimada entre *A. catarinae* y *A. diazi* fue de $2N_m=0.0-1.8/\text{Generación}$ y $2N_m=0.4-1.8/\text{Generación}$ con respecto a *A. meeki*, siendo no significativo y con una relación negativa entre probabilidad y número de migrantes en ambos casos. El modelo de migración de *A. catarinae* con respecto de *A. diazi* y *A. meeki* no se ajustó significativamente en ningún escenario.

El tamaño efectivo poblacional histórico (posterior a la separación) estimado para las tres especies tiene probabilidades muy bajas, atribuible a la resolución del gen *Cytb* (Tabla 9). El tamaño efectivo poblacional para *A. diazi* se estimó entre los $N_e=140,000-380,000$ individuos (HPD \geq 95%) pero con probabilidades posteriores menores al 50%. Mientras que se estimó un tamaño efectivo poblacional entre $N_e=80,000-380,000$ individuos para *A. meeki* pero con probabilidades aún menores. Por otro lado, el tamaño efectivo poblacional de

A. catarinae tuvo un mínimo menor que en las otras dos especies $N_e=50,000-380,000$ individuos. El tamaño efectivo poblacional inicial para el ancestro común de las tres especies se estimó en $N_e=30,000-380,000$ individuos.

Tabla 9. Rangos de tiempos de divergencia, tasa de migración y tamaño efectivo poblacional de *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través de IMA2 para el gen *Cytb* (HPD \geq 95%).

	Tiempos de divergencia (MA)	Tasa de Migración/Generación	Tamaño Efectivo Poblacional (Individuos)
<i>A. diazi</i>			140,000-380,000
<i>A. diazi/A. meeki</i>	0.0-0.42	0.3-1.9ns*	
<i>A. meeki</i>			80,000-380,000
<i>A. diazi/A. catarinae</i>	0.044-0.46	0.0-1.8ns	
<i>A. catarinae</i>			50,000-380,000
<i>A. meeki/A. catarinae</i>	0.29-0.46	0.4-1.8ns	

Nota: ns=no significativo, *ajuste significativo a modelo de migración anterior y posterior a la separación.

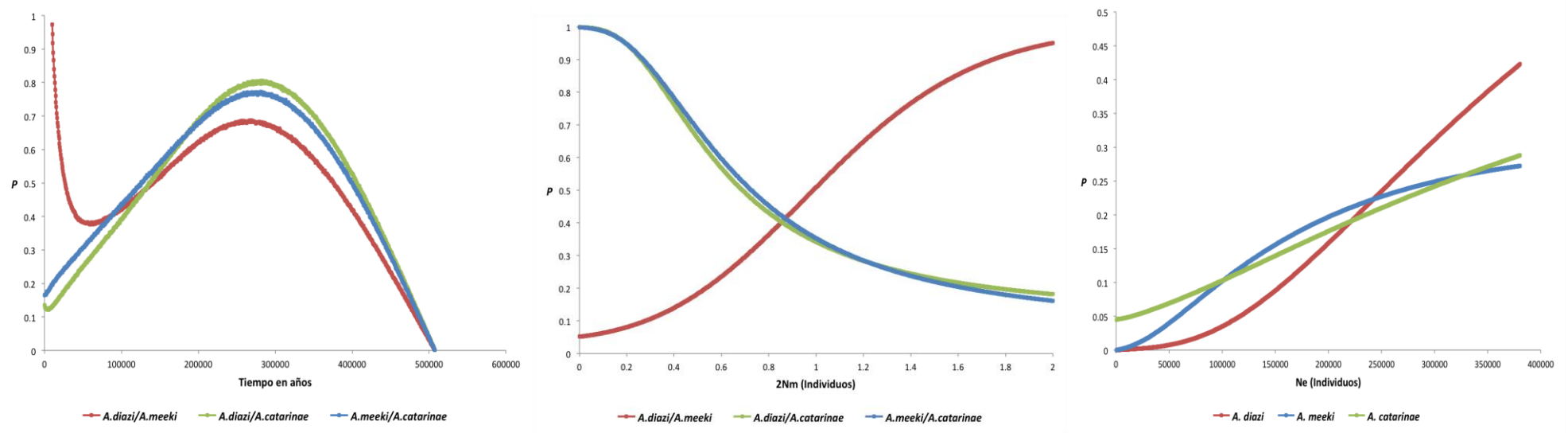


Figura 16. Distribución de las probabilidades en el análisis de tiempos de divergencia (Izquierda), tasa de migración (Centro) y tamaño efectivo poblacional histórico (Derecha) a través de IMA2 con el gen *Cytb* para diferentes escenarios de ancestría-descendencia entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

10.2.2 Microsatélites.

Diversidad Genética y Dinámica Poblacional

El número promedio de alelos por locus es de $N_a=10.4\pm 3.5$ alelos. Mientras que el número promedio de variantes genéticas que contribuyen a la heterocigosis en cada locus (Número de Alelos Efectivos N_{ae}) es de $N_{ae}=5.8\pm 2.2$ (Tabla 10).

El número de alelos promedio de *A. diazi* por el total de loci es de $N_a=9.9\pm 3.0$, con un número de alelos efectivos de $N_{ae}=4.9\pm 1.8$. Mientras que *A. meeki* tiene un promedio de alelos por total de loci de $N_a=11.3\pm 2.3$ y un número de alelos efectivos de $N_{ae}=6.9\pm 2.1$. *Allotoca catarinae* tiene una diversidad alélica menor con un promedio de alelos por total de loci de $N_a=10.0\pm 6.3$ y un número de alelos efectivos de $N_{ae}=5.5\pm 3.9$. Esta última especie tiene una variación mayor en el número de alelos y en sus frecuencias (Tabla 10, Tabla C1).

La proporción de alelos nulos en el total de los loci es de $P_{an}=0.06\pm 0.06$ siendo no significativa después de la corrección de Bonferroni. Por cada homocigoto esperado en el total de los locus, se predicen 0.06 ± 0.03 heterocigotos con una probabilidad menor al 95%.

Se encontró un desequilibrio de ligamiento promedio de $DL=0.06\pm 0.03$ en los loci. Siendo no significativa esta desviación del equilibrio después de la corrección de Bonferroni. Sin embargo, se encontró un desequilibrio de ligamiento significativo ($P<0.05$), interpretado como una asociación no al azar entre los loci AS2 y ZT1.9 en *A. diazi*. Este hecho nos obliga a utilizar sus covarianzas, pues la varianza aditiva total ya no es la suma de todos los loci, si no que hay que contar la covarianza entre estos loci. Esta covarianza es negativa la cual reduce la variación genética (Efecto Bulmer; Bulmer, 1971).

Tabla 10. Diversidad Alélica en 7 loci de Microsatélites por locus y por especie (*Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*).

Locus		N_a	N_{ae}	P_{an}	DL
XC18		14.0±3.6	7,6±0.9	0.05	--
ZT1.6		10.0±3.6	5.9.0±3.3	0.04	--
ZT1.7		12.0±2.0	7.0±0.3	0.04	--
IW196		9.3±2.1	4.4±2.1	0.06	--
XC25		5.0±3.0	2.0±0.8	0.07	--
AS2		7.3±1.5	5.0±1.6	0.12	--
ZT1.9		15.0±1.7	8.6±3.3	0.07	--
Total		10.4±3.5	5.8±2.2	0.06±0.03	
Especie	n	N_a	N_{ae}	P_{na}	DL
<i>A. diazi</i>	35	9.9±3.0	4,9±1,8	0.10	AS2-ZT1.9*
<i>A. meeki</i>	22	11.3±2.3	6.9±2.1	0.01	--
<i>A. catarinae</i>	52	10.0±6.3	5.5±3.9	0.05	--
Total	96	10.4±0.8	6.2±1.0		

Nota: n=Tamaño de muestra, N_a =Número Promedio de Alelos, N_{ae} =Número Promedio de Alelos Efectivos, P_{an} =Proporción de Alelos Nulos después del Corrección de Bonferroni (*= $P>0.05$) y DL=Desviación del Equilibrio de Ligamiento después del Corrección de Bonferroni (*= $P<0.05$).

La comparación de las frecuencias de heterocigosis observada (H_o) y la esperada (H_e), permitió encontrar que los loci incluidos en los análisis estadísticos para *A. diazi* (excepto los loci XC18 y ZT1.6) y *A. catarinae* (excepto los loci ZT1.6, IW196 y XC18) y sus poblaciones, presentan una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg, después de la corrección de Bonferroni ($P<0.05$) (Tabla 11).

Se identificaron tres cuellos de botella recientes significativos para cada una de las especies y bajo distintos modelos (IAM, TPM y SMM) a través de Bottleneck v1.2.02 tras la corrección de Bonferroni.

Se identificó un cuello de botella atribuido a deficiencia de heterocigosis en *A. diazi* (SMM- $P<0.005$), soportado por el coeficiente de endogamia positivo y significativo ($F_{is}=0.141$; $P<0,05$). Mientras que en *A. meeki* el cuello de botella es atribuido a un exceso de heterocigosis respecto a la que se esperarían en un modelo de alelos infinitos (IAM- $P<0.05$), pero no bajo los otros modelos. Este hecho es soportado por el coeficiente de endogamia no significativo obtenido en el análisis de la varianza molecular ($F_{is}=0.088$; $P>0.05$). En el caso de *A. catarinae*, el modelo IAM y SMM soportan significativamente la desviación de Hardy Weinberg y se identifica un cuello de botella en cada modelo; por exceso de heterocigosis (IAM- $P<0.005$) y por deficiencia de

heterocigosis (SMM- $P < 0.005$). El cuello de botella identificado a partir del modelo SMM, es soportado por el coeficiente de endogamia significativamente diferente de cero (deficiencia de heterocigotos) ($F_{is} = 0.151$; $P < 0.05$).

Tabla 11. Diversidad genética, equilibrio de Hardy Weinberg y cuellos de botella para 7 loci de microsatélites en *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

Especies	Locus	H _o	H _e	H-W	F _{is}	BNK IAM/TPM/SSM
<i>A. diazi</i>	XC18	0.84	0.86	--	0.141	-/-*
	ZT1.6	0.84	0.78	--		
	ZT1.7	0.73	0.88	<0.001		
	IW196	0.62	0.76	<0.05		
	XC25	0.30	0.46	<0.001		
	AS2	0.60	0.81	<0.001		
	ZT1.9	0.70	0.83	<0.05		
<i>A. meeki</i>	XC18	0.83	0.90	--	0.088	* / - / -
	ZT1.6	0.78	0.92	--		
	ZT1.7	0.89	0.88	--		
	IW196	0.72	0.88	--		
	XC25	0.67	0.67	--		
	AS2	0.78	0.88	--		
	ZT1.9	0.83	0.90	--		
<i>A. catarinae</i>	XC18	0.71	0.89	<0.001	0.151	* / - / *
	ZT1.6	0.66	0.74	--		
	ZT1.7	0.81	0.87	<0.05		
	IW196	0.59	0.61	--		
	XC25	0.22	0.20	--		
	AS2	0.59	0.79	<0.001		
	ZT1.9	0.66	0.93	<0.001		

Nota: H_o=Frecuencia de heterocigosis observada y H_e= Heterocigosis esperada. H-W=Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg F_{is}=Coeficiente de endogamia de Wright (**Negritas**- $P < 0.05$) Identificación de cuellos de botella (BNK) estimado por la prueba de Wilcoxon ($P < 0.05$), basado en el modelo de alelos infinitos (IAM), modelo con dos fases (TPM) y modelo paso a paso (SMM) (* significativo; - no significativo). Los valores de significancia se corrigieron por el método de Bonferroni (en H-W, F_{is} y BNK).

Estructura Genética

Se encontró un valor bajo de variación genética total aportada por cada individuo ($F_{it} = 0.230$) pero siendo significativamente diferente de cero ($P < 0.05$) (Tabla 12), indicando deficiencia de heterocigotos por endogamia. La mayor parte de la variación encontrada es explicada por la variación entre los individuos totales (76.90% de la variación, $P < 0.05$). La variación entre los

individuos dentro de cada especie fue de $F_{is}=11.80$ ($P<0.05$) y representa el 11.80% del total.

El nivel de diferenciación total entre especies ($F_{st}=0.113$, $P<0.05$) indica una baja estructuración. Los valores más bajos de F_{st} encontrados los presenta *A. diazi* respecto de *A. meeki* ($F_{st}=0.084$, $P<0.05$). El número de migrantes estimado por generación entre *A. diazi* y *A. meeki* fue de $N_m=5.5$. La variación genética entre *A. catarinae* y *A. diazi* fue de $F_{st}=0.133$ ($P<0.05$) mientras que presento una $F_{st}=0.109$ respecto de *A. meeki*. El número de migrantes en *A. catarinae* con respecto a *A. diazi* y *A. meeki* fue de $N_m=3.3$ y $N_m=4.1$, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 12. Nivel de estructura genética a través del análisis de varianza molecular (AMOVA) para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* con 7 loci de microsatélites.

Grupos	F_{st}	F_{is}	F_{it}	%Entre Grupos	%Dentro de los Grupos	%Entre Individuos	P
<i>A. diazi</i>							
<i>A. meeki</i>	0.113	0.133	0.230	11.30	11.80	76.90	<0.05
<i>A. catarinae</i>							

Nota: F_{it} , F_{st} y F_{is} =Índices de fijación de Wright (Tota, entre grupos, dentro de los grupos).

Tabla 13. Diferenciación genética F_{st} estimada para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* con 7 loci de microsatélites.

	<i>A. diazi</i>	<i>A. meeki</i>	<i>A. catarinae</i>
<i>A. diazi</i>	--	5.5	3.3
<i>A. meeki</i>	0.084*	--	4.1
<i>A. catarinae</i>	0.133*	0.109*	--

Nota: Valores de F_{st} pareados (bajo la diagonal) y número de migrantes (N_m ; sobre la diagonal). * Valor de significancia $P<0.05$ después de la corrección de Bonferroni.

A través de inferencia Bayesiana se encontró que el máximo de grupos posibles que mejor explican la estructura genética entre las tres especies es $K=2$. Este resultado fue el mismo en ambos casos; tanto por la metodología de Evanno *et al.* (2005), como en la utilización del DIC (Fig. 17).

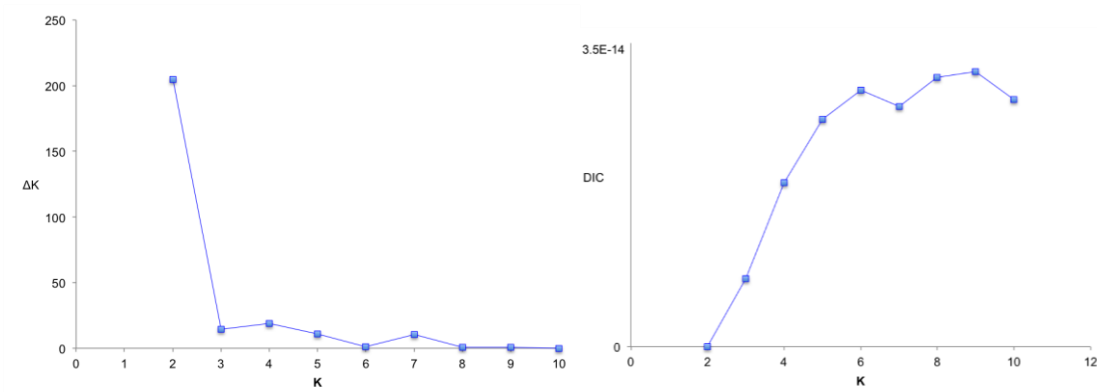


Figura 17. Número de grupos (K) que mejor explican la estructura genética entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* por el criterio ΔK (Izquierda) (Evanno *et al* 2005) y de Información de la Desviación-DIC (Derecha) (Spielgelharter *et al.* 2002).

El valor de K máximo estimado (siendo el mismo en ambos análisis) mostró patrones de estructura distintos entre las metodologías utilizadas. Por un lado, el análisis por medio del software Structure v2.3.3 mostró un patrón donde se observan dos grupos genéticos. En uno de los grupos se incluyen a *Allotoca diazi* y a *A. meeki* con una proporción de individuos asignados a este grupo de 0.69 y 0.67 respectivamente (Fig. 18 Arriba y 19). Mientras que la proporción restante es asignada al otro grupo en el cuál se encuentra *A. catarinae*. La proporción de individuos de *A. catarinae* asignados en este segundo grupo es de 0.68 y sólo 0.32 es asignado al grupo en el que se encuentra *A. diazi* y *A. meeki*.

Por otro lado, el análisis por medio del software TESS v2.3, mostró que no existe estructura genética entre las tres especies y que la proporción de asignación de individuos a los dos grupo es de alrededor de 0.50 (Fig. 18; Abajo), por lo que no se podría determinar de qué grupo proviene cada alelo si se elige al azar.

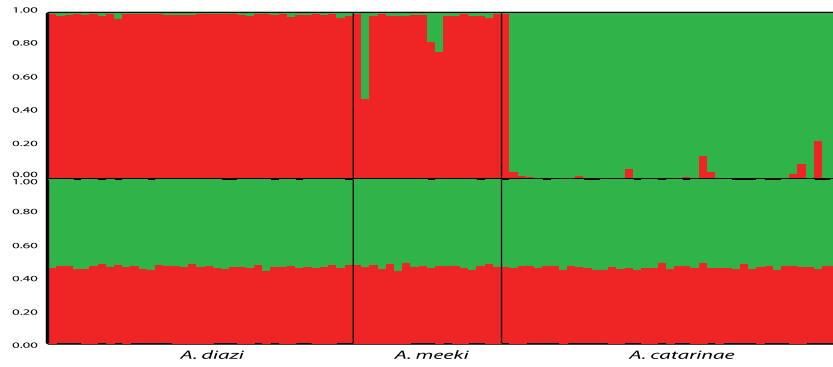


Figura 18. Estructura genética a través de Inferencia Bayesiana para (1) *Allotoca diazi*, (2) *A. meeki* y (3) *A. catarinae*. Arriba = Valor de K=2 a través del (criterio ΔK (Evanno *et al.* 2005) y abajo = criterio de información de la desviación-DIC (Spielgelhalter *et al.* 2002).

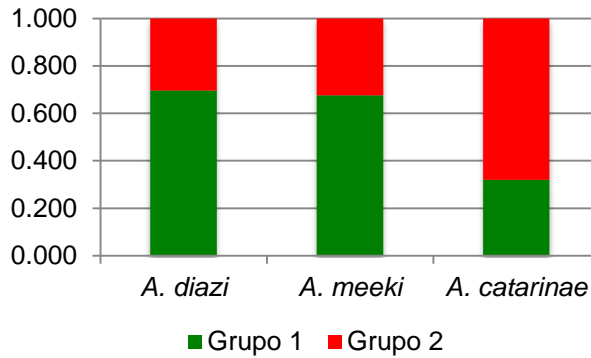


Figura 19. Proporción de individuos asignados de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a cada grupo estimado (K=2) a través de Structure v2.3.3.

El valor observado de R_{st} ($R_{st}=0.178$) para todos los loci no fue significativamente diferente del esperado ($pR_{st}=0.099$) tras el análisis de permutaciones ($P>0.05$ donde $H_0:R_{st}=pR_{st}$), ni significativamente distinto del valor de $F_{st}=0.113$, lo que sugiere que la variación que genera la diferencia de tamaños alélicos no contribuye a la estructuración genética entre *A. catarinae*, *A. diazi* y *A. meeki* (Tabla 14). Por el contrario, el valor observado de F_{st} es significativo en todos los loci, por lo tanto la diferenciación genética observada en los anteriores análisis puede ser explicada por la relación heterocigosis observada/esperada. Los valores estimados por cada loci presentan el mismo patrón.

Tabla 14. Nivel de Estructura Genética a través de R_{st} entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* con análisis de permutaciones.

Locus	R_{st}	pR_{st} (95% I. C.)	F_{st}
XC18	0.072 ns	0.095 (-0.015-0.338)	0.102*
ZT1.6	0.527 ns	0.139 (-0.012-0.441)	0.146*
ZT1.7	0.266 ns	0.088 (-0.014-0.310)	0.091*
IW196	0.228 ns	0.162 (-0.015-0.513)	0.189*
XC25	0.158 ns	0.083 (-0.016-0.230)	0.088*
AS2	-0.001 ns	0.113 (-0.015-0.356)	0.113*
ZT1.9	0.141 ns	0.048 (-0.018-0.183)	0.051*
Todos los loci	0.178 ns	0.099 (0.026-0.205)	0.113*

Nota: Donde $H_0: R_{st} = pR_{st}$ ns=no significativo y *significativo ($P < 0.05$) después de corrección de Bonferroni. R_{st} =Valores observados, pR_{st} =Valores esperados tras análisis de permutaciones e I. C.=Intervalo de confianza del 95%.

Demografía Histórica y Tiempos de Divergencia

Los tiempos de divergencia estimados a través de IMA2 y combinando los datos de los 7 loci de microsatélites y las secuencias del gen mitocondrial *Cytb* sugieren que la separación entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* tuvo lugar en los últimos 8,000 años (HPD \geq 95%) (Fig. 20). Los resultados obtenidos no son congruentes con los tiempos de divergencia obtenidos a través del gen mitocondrial *Cytb*. Se estimó un tiempo de divergencia entre *A. diazi* y *A. meeki* 7,000-400 años (Tabla 15), sin embargo se debe tomar en cuenta que esta divergencia se estima sólo si hubieran realmente divergido genéticamente lo cual no se observa en ambos marcadores moleculares, por lo que este evento correspondería a la separación física. Mientras que el tiempo de divergencia de *A. catarinae* respecto de *A. diazi* y *A. meeki* pudo ocurrir entre los 8,000 y los 700 años (HPD \geq 95%), con mayor probabilidad hace 2500-1800 años.

La tasa de migración estimada entre *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* no fue significativa y muy baja (Tabla 15, Fig. 20), mientras que el modelo de migración si fue significativo en los tres casos, indicativo de que hubo una posible conexión antes de su separación. La tasa de migración entre *A. diazi* y *A. meeki* se estimó de $2N_m = 0-1.8/\text{Generación}$ (HPD \geq 95%). La tasa de migración entre *A. diazi* y *A. catarinae* fue de $2N_m = 0-1.8/\text{Generación}$.

El tamaño efectivo poblacional histórico es mayor en *A. meeki* ($N_e=6,700-52,400$ individuos) que en *A. diazi* ($N_e=3,900-17,000$ individuos) y *A. catarinae* ($N_e=3,400-19,000$ individuos) con altos valores de probabilidad (HPD \geq 95%). Mientras que el tamaño efectivo poblacional inicial para el ancestro común del complejo se estimó en $N_e=60,000-70,000$ individuos.

Tabla 15. Rangos de tiempos de divergencia, tasa de migración y tamaño efectivo poblacional de *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través de IMA2 para el gen *Cytb* (HPD \geq 95%).

	Tiempos de divergencia (MA)	Tasa de Migración/Generación	Tamaño Efectivo Poblacional (Individuos)
<i>A. diazi</i>			3,900-17,000
<i>A. diazi/A. meeki</i>	0.0004-0.007	0.0-1.8ns*	
<i>A. meeki</i>			6,700-52,400
<i>A. diazi/A. catarinae</i>	0.0007-0.008	0.3-1.4ns*	
<i>A. catarinae</i>			3,400-19,000
<i>A. meeki/A. catarinae</i>	0.0008-0.008	0.4-1.4ns*	

Nota: ns=no significativo, *ajuste significativo a modelo de migración anterior y posterior a la separación.

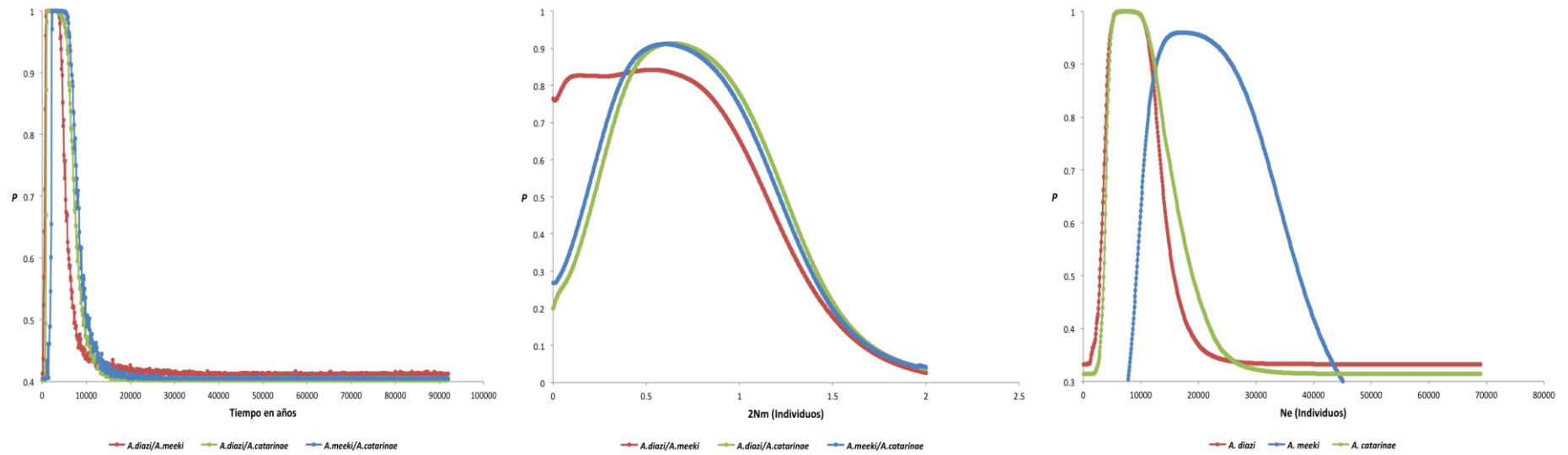


Figura 20. Distribución de las probabilidades en el análisis de tiempos de divergencia (Izquierda), tasa de migración (Centro) y tamaño efectivo poblacional histórico (Derecha) a través de IMA2 con 7 loci de microsatélites para diferentes escenarios de ancestría-descendencia entre *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

10.2.3 Predicciones de Nicho Ecológico en el Pasado.

Periodo Interglaciario ~120-140,000 Años

Las predicciones para este periodo muestran que los nichos potenciales para ser habitados por *Allotoca diazi* (AUC=0.994, RM=0.01), *A. meeki* (AUC=1.0, RM=0.1) y *A. catarinae* (AUC=1.0, RM=0.1) eran reducidos en el país. Los nichos potenciales de *A. diazi* y *A. meeki* se encontraban por encima de la franja que separa la Depresión del Balsas del Corredor Tarasco (~1600 m.s.n.m.) con límites de confianza mayores al 95% y probabilidades mayores al 70% (Fig. 21, Izquierda).

Los nichos potenciales predichos para *A. diazi* incluyen la región del lago de Pátzcuaro mientras que no incluyen ni la zona del lago de Zirahuén, ni la subcuenca del río Cupatitzio. Las 5 variables que más influyeron en la presencia o ausencia de esta especie en este periodo en base al modelo fueron la temperatura media del cuatrimestre más cálido, estacionalidad de la temperatura, temperatura media del cuatrimestre más lluvioso, precipitación del cuatrimestre más lluvioso y la temperatura anual. Mientras que para *A. meeki* se predice su distribución sólo en regiones de mayor altitud de la que se encuentra actualmente el lago de Zirahuén, además de la región de Opopeo y el río La Palma con baja probabilidad. Las 5 variables de importancia para la creación del modelo predictivo de nichos potenciales fueron la estacionalidad de la temperatura, precipitación del mes más lluvioso, oscilación de la temperatura anual, oscilación diurna y la isotermalidad.

El modelo de nichos potenciales para *A. catarinae* en este periodo muestra una distribución potencial localizada, posiblemente porque sólo en la zona del río Cupatitzio existían las condiciones necesarias para su hábitat, soportando la evidencia de que dicha región tiene como mínimo ~120-140,000 años de su formación y que desde entonces presentaba condiciones ambientales distintas a las regiones con las que colinda. Las cinco variables que más influyeron en la presencia o ausencia de esta especie en este periodo en base al modelo fueron la estacionalidad de la temperatura, precipitación del mes más seco, precipitación del cuatrimestre más seco, precipitación del cuatrimestre más lluvioso y la isotermalidad.

Periodo del Último Máximo Glaciar ~21 Años

Se encontró diferencias importantes respecto a las predicciones de ~120-140,000 años (Fig. 21). En general, las áreas potenciales predichas para *Allotoca diazi* (AUC=0.996, RM=0.1) y *A. meeki* (AUC=1.0, RM=0.01) se encuentran en altitudes relativamente más bajas que en el periodo interglacial pero en el límite con la Depresión del Balsas (Fig. 21, Centro). Esto significa que dichas regiones mantuvieron condiciones muy distintas al menos hace 21,000 años.

Las predicciones de nichos potenciales con probabilidades mayores al 50% (L.C. 95%) para *A. diazi* y *A. meeki* mostraron solapamiento y una reducción importante en el área de distribución potencial.

En el caso de *Allotoca diazi*, se predice que existían las condiciones necesarias para su existencia con una probabilidad de 50-90% sólo en la cuenca del Lago de Pátzcuaro y la región occidente de la cuenca. El área potencial predicha incluye la región de la cuenca del lago de Zirahuén, hablando de posibles condiciones ambientales parecidas durante este periodo de tiempo. Las cinco variables que más influyeron en la presencia o ausencia de esta especie en este periodo en base al modelo fueron la precipitación del cuatrimestre más seco, del mes más seco, del mes más cálido, estacionalidad de la temperatura y la isotermalidad.

La predicción de nicho ecológico para *A. meeki* mostró una distribución localizada sólo en la cuenca del lago de Zirahuén. Las cinco variables que más influyeron en la presencia o ausencia de esta especie en este periodo en base al modelo fueron la precipitación del mes más seco, más lluvioso, del cuatrimestre más lluvioso, estacionalidad de la precipitación y la temperatura estacional.

Allotoca catarinae mostró un rango menor de nichos potenciales y además de baja probabilidad (AUC=1.0, RM=0.01), lo que sugiere que la subcuenca del río Cupatitzio poseía condiciones adversas para ser habitada por esta especie. Las cinco variables que más influyeron en la presencia o ausencia de esta especie en este periodo en base al modelo fueron la estacionalidad de la temperatura, isotermalidad, precipitación del cuatrimestre más lluvioso y del mes más seco, temperatura media del cuatrimestre más frío.

Periodo entre los años 1950 y 2000

Este periodo representa las condiciones actuales y permite hacer comparaciones climáticas con las predicciones del pasado.

Se observó que el área potencial de nicho ecológico para las tres especies es muy amplia, cubriendo una gran extensión en el país. Los valores de AUC y RM obtenidos para *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* son AUC=0.900, RM=10; AUC=0.972, RM=1.0; AUC=0.984, RM=0.1, respectivamente. En este periodo se observan las mejores condiciones para la existencia de las tres especies, en los cuales se sobrelapan las áreas potenciales de distribución (Fig. 21, derecha y Fig. 22).

Las probabilidades más altas de las tres especies se encuentran sobrelapadas en la franja que separa la Depresión del Balsas y el Corredor Tarasco.

Sin embargo, aunque existen regiones idóneas para ser habitadas, no existen conexiones físicas entre sí, por lo cual una dispersión natural en ese periodo de tiempo es imposible. Las cinco variables que más influyeron en el periodo entre los años 1950-2000 en la presencia o ausencia de las tres especies, según el modelo de predicción fueron la estacionalidad de la temperatura, precipitación del cuatrimestre más cálido, precipitación anual y la del cuatrimestre más lluvioso.

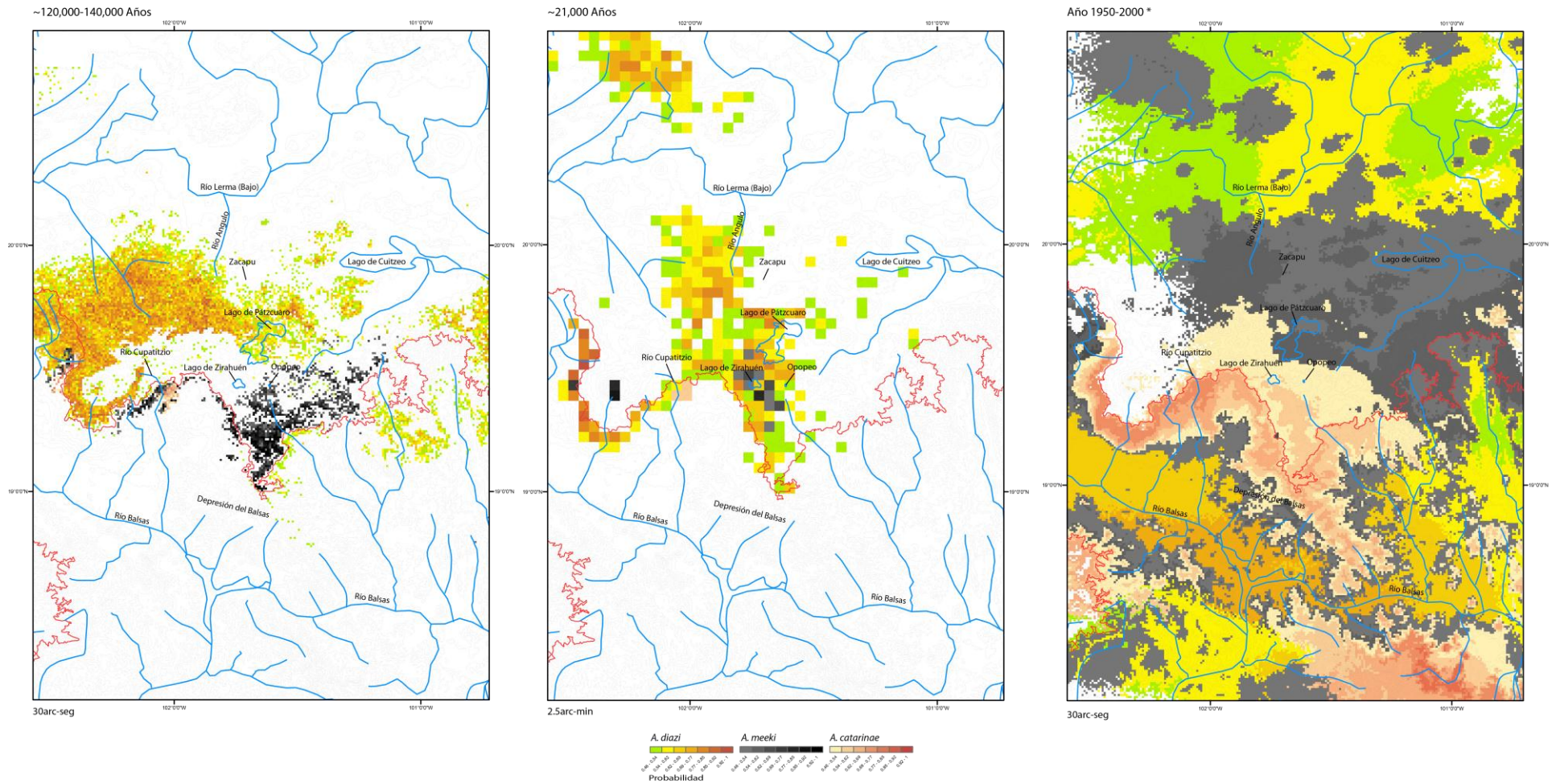


Figura 21. Modelos de predicción de nicho ecológico en el pasado para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través de máxima entropía: Periodo interglaciar (~120,000-140,000 años) y periodo del último máximo glacial (~21,000 Años) y desde el año 1950-2000. *Las probabilidades más altas de *A. diazi* y *A. meeki* están sobrelapadas con las de *A. catarinae*. 30arc-seg y 2.5arc-min indican el tamaño de celda utilizado.

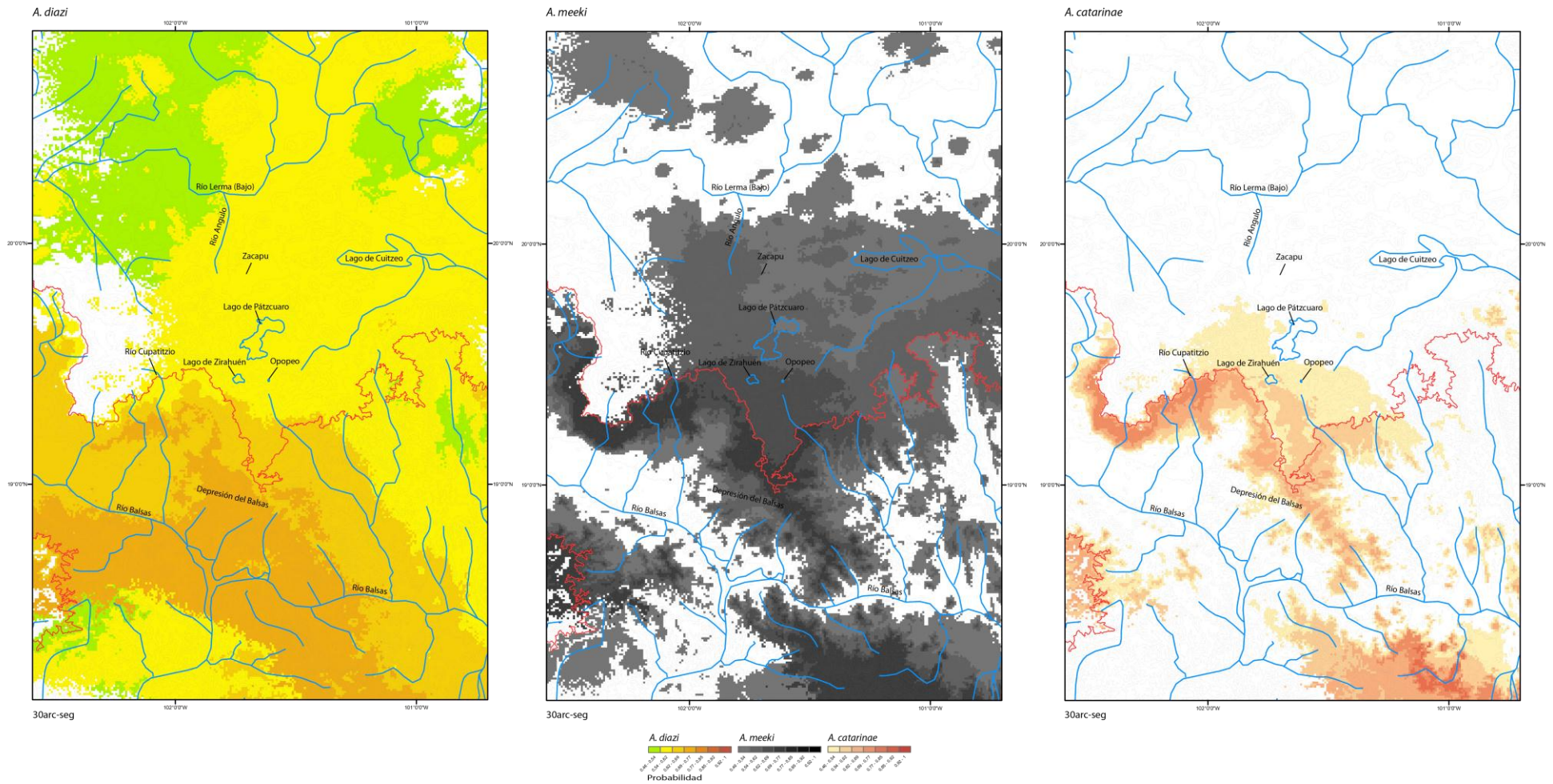


Figura 22. Modelos de predicción de nicho ecológico en el pasado para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través de máxima entropía: Desde el año 1950-2000. 30arc-seg indican el tamaño de celda utilizado.

10.2.2 Predicciones de Nicho Ecológico en el Futuro e Identificación de Unidades de Conservación.

Periodo entre los años 2020, 2050 y 2080

Bajo el modelo A1B, en el cual se baso la presente predicción, se espera un incremento de 1°C para el año 2020, mientras que a partir del año 2050 se espera un incremento de la temperatura más lento, alrededor del 0.5°C por década. Esto debido a que el incremento poblacional y el impacto del hombre en el ambiente en dicho modelo se espera ser frenado y avanzar lentamente o mantenerse como hasta el año 2050. Por lo que el cambio climático más brusco bajo este modelo se espera durante la primera mitad del siglo actual.

Los modelos predichos son congruentes con estas condiciones para las tres especies. Se espera que el área potencial e idónea para el hábitat de *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* se reduzca bruscamente para el año 2020. De hecho, no se predice área potencial para *A. catarinae* para el año 2020. Mientras que para *A. diazi* y *A. meeki* además de reducirse, las áreas potenciales se ubican en regiones de mayor altitud.

Para el año 2050, momento en que se frena el crecimiento poblacional principalmente, se predice que aparecerá un área potencial para *A. catarinae* muy localizada y de baja probabilidad en la región del río Cupatitzio. Se predice que el área potencial de *A. diazi* y *A. meeki* se mantendrá en regiones de mayor altitud y reducida.

Hacia el año 2080 durante un crecimiento poblacional lento y equilibrio entre el manejo de recursos a partir del año 2050, se observa que no es posible la recuperación de condiciones idóneas para el establecimiento de las tres especies y con alto grado de reducción de su área potencial. Comparando con el área potencial predicha para el periodo comprendido entre 1950 y el año 2000, la reducción del número de nichos potenciales es demasiado alta hacia el futuro, inclusive en mayor nivel a la predicha en el periodo interglaciar y el glaciar de los últimos ~140,000 y ~21,000 años, respectivamente.

Con ambos tipos de marcadores moleculares las tres especies representan dos posibles grupos genéticos aún poco diferenciados. Aunque cada especie habita una región biogeográfica limitada por barreras geográficas bien definidas, es difícil identificar las unidades de conservación a través de la definición de las OCU.

A pesar de que las tres especies estudiadas presentan divergencias relativamente bajas, estas habitan regiones independientes entre sí, las cuales poseen condiciones de hábitat y problemáticas particulares, por lo que cualquier perturbación las afectaría de manera independiente, como se ha visto en el pasado y en las predicciones al futuro, además, cada grupo genético posee un acervo genético único a causa de su historia demográfica y evolutiva, y el flujo génico entre los tres grupos ha sido interrumpido. Sin embargo, los tiempos de divergencia *A. catarinae* no corresponden a ningún evento geológico que implique la conexión y desconexión de la subcuenca del río Cupatitzio con los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén, por lo que la actual distribución de *A. catarinae* puede no haberse originado de manera natural. Por lo tanto sólo dos regiones hidrográficas deben ser consideradas como Unidades Operacionales de Conservación independientes, Pátzcuaro y Zirahuén.

Por otro lado, las dos regiones actualmente están sufriendo alto impacto por la actividad humana. Es posible que la población de *Allotoca diazi* del lago de Pátzcuaro haya sido extirpada como sucedió en el lago de Zirahuén para *A. meeki*, por lo que su única población conocida está restringida a una región de alta actividad humana. *Allotoca meeki* posee una sola población de la cual sólo se tiene registro en el presente trabajo y que habita un pequeño afluente de la presa de Opopeo.

De acuerdo a la información genética obtenida, las dos especies han sufrido grandes cambios en su tamaño efectivo poblacional, lo que conlleva a la acumulación de mutaciones deletéreas, pueden comprometer su sobrevivencia a largo plazo.

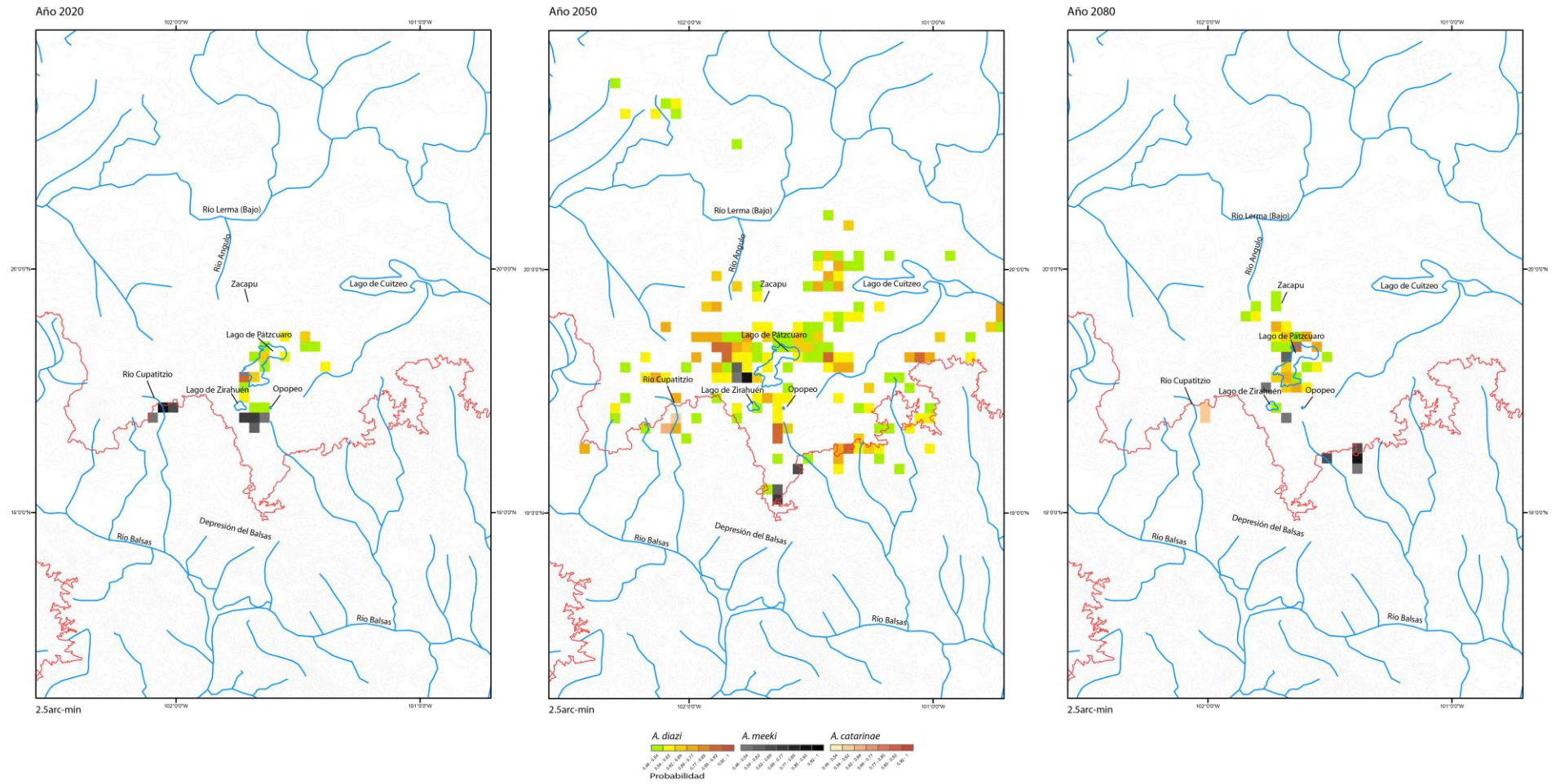


Figura 23. Modelos de predicción de nicho ecológico en el futuro para *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* a través de máxima entropía: Año 2020, 2050 y 2080. 2.5arc-min indican el tamaño de celda utilizado.

XI. Discusión

La historia biogeográfica y evolutiva de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* es compleja. Las regiones en las que actualmente habita *A. diazi* y *A. meeki* son muy recientes en contraste a la que habita *A. catarinae*. El complejo “*Allotoca diazi*” comprende especies que tienen diferencias genéticas muy pequeñas, tanto para marcadores moleculares relativamente conservados (ADNmt) como para marcadores altamente variables (ADN-nuclear), haciendo difícil su diferenciación con los diferentes métodos utilizados. Lo cual es soportado por las escasas diferencias morfológicas reportadas (Regan, 1906-1908; Hubbs, 1926 y 1932, Hubbs y Turner 1939; De Buen, 1942; Hieronimus, 1995; Meyer *et al.* 2001).

11.1 Filogeografía e Historia Evolutiva de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*

La variación genética estimada en el gen *Cytb* en las tres especies es atribuida a deriva génica y mutación, puesto que no se encontró desviación significativa de neutralidad (Kimura, 1983) en los valores de D_t y F_s de F_u y L_i en las tres especies (Tabla 8).

En el análisis filogenético a través de Neighbor-Joining, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, las tres especies conforman dos grupos con escasa diferenciación. El primer grupo está conformado por *A. catarinae*, el cual es monofilético y presenta una distancia genética de $\overline{Dp}=0.6\%$ con respecto de *A. diazi* y *A. meeki*, estos últimos no se recobran como monofiléticos y conformando un único haplogrupo y las distancias genéticas entre si fueron de $\overline{Dp}=0.3\%$. Las distancias genéticas son menores a las reportadas para goodeidos 1.7-11% (Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004) y para los vertebrados en general (~2%) para el marcador de ADNmt (Brown *et al.* 1979; John y Avise, 1998; Bradley y Baker, 2001). A través del análisis de microsatélites, ambos grupos genéticos (*A. catarinae* + *A. diazi*-*A. meeki*) son recobrados como grupos genéticamente estructurados únicamente a través de Inferencia Bayesiana con el software Structure v2.3.3, sin embargo, en el análisis de asignación se presentó una baja proporción de individuos por

especie asignados correctamente a cada grupo (entre 0.3-0.7 del total de individuos). Por lo tanto, las bajas diferencias genéticas entre las tres especies, los resultados de estructura y asignación genética para ambos marcadores y las relaciones filogenéticas encontradas para las tres especies sugieren un proceso de “linajes incompletos” o “especies incipientes”, o bien, múltiples eventos de flujo génico (Maddison, 1997; Arbogast *et al.* 2002; Yun yu *et al.* 2011; Rosenfeld *et al.* 2012). Todo ello refuerza la controversia taxonómica que existe en torno a las tres especies, pudiéndose tratar de un solo linaje evolutivo y por lo tanto una sola especie evolutiva o filogenética.

La hibridación puede ser causada por la transferencia de alelos de una especie a otra y puede fácilmente conseguir la no monofilia recíproca en un árbol filogenético o escasas de resolución (Edwards *et al.* 2008). La posibilidad de la hibridación en la naturaleza entre las tres especies objeto de estudio es muy baja ya que no se tiene registro de ello entre especies de la misma familia, que tienen distintos niveles de divergencia genética y que además cohabitan una misma región. En suma, tiene una escasa capacidad de dispersión.

Para contrastar la hipótesis de la especiación incipiente es necesario describir cuatro escenarios generales: (1) el patrón genético dentro de cada “especie” y el flujo génico entre ellas se ha dado durante mucho tiempo desde su aislamiento a tal grado que no se refleja divergencia entre ellas sino al contrario, representan una única especie. Si este escenario fuera cierto, se esperaría baja estructura genética y alta proporción de individuos de una especie asignados a otra, además de evidencia de una conexión secundaria o un mecanismo que permitiera el intercambio de individuos entre cuentas actualmente aisladas. (2) Las especies fueron aisladas por suficiente tiempo para que la especiación ocurriera, pero recientemente o posterior al evento de especiación ocurrió hibridación interespecífica causando introgresión alélica. Si éste fuera el caso, se esperaría que los resultados a través de microsatélites revelarán bajos niveles de estructura genética y por lo tanto niveles relativamente altos de asignación de individuos de una especie a los de otra, y en el gen mitocondrial se observaría alta diversidad genética como de número de haplotipos compartidos. (3) La hibridación ocasional antigua provocaría un patrón de no monofilia y el alto nivel de diferenciación. Bajo este último escenario, se esperaría que la información de microsatélites mostrara una

proporción baja de asignación de individuos de una especie a la otra y soportado por niveles altos de estructura genética. (4) La separación entre las tres especies es tan reciente que aún no reflejan diferencias genéticas por lo que se podrían considerar especies incipientes o linajes incompletos. En este escenario se esperaría que los fechamientos fueran congruentes con eventos geológicos o eventos que permitieran la dispersión del grupo en la actual distribución. Se esperaría además que el nivel de diferenciación genética fuera bajo y que tuvieran alta proporción de individuos de una especie asignados a otra. En los escenarios en los que se sugiere un flujo génico posterior a la separación se debe tomar en cuenta la evidencia geológica que soporte una conexión física secundaria entre los cuerpos de agua y la capacidad de dispersión de la especie (Maddison, 1997; Rosenberg y Feldman, 2002; Arbogast *et al.* 2002; Maddison y Knowles, 2006; Qu *et al.* 2012).

Sólo algunos resultados obtenidos soportan la hipótesis de hibridación ocasional posterior al proceso de especiación entre *A. diazi* y *A. meeki*. Se comparten haplotipos del gen *Cytb* (2 haplotipos) y donde *A. diazi* tiene alta proporción de individuos asignados a *A. meeki* (hasta ~0.5-0.7) en ambos análisis por medio de microsatélites. Se estimó una diversidad genética baja para *A. diazi* en el gen *Cytb* ($h=0.78$ $\pi=0.0030$), mientras que para *A. meeki* fue aún menor ($h=0.52$ $\pi=0.0007$), indicativo de importantes cambios demográficos históricos en ambas especies (Allendorf *et al.* 2007). La información de los microsatélites mostró un nivel bajo de diferenciación genética ($F_{st}=0.084$) con respecto a *A. meeki* (Excoffier *et al.* 1992; Ray *et al.* 2003). Lo que sugiere que si se ha dado un proceso de hibridación ocasional éste se produjo recientemente puesto que los loci de microsatélites poseen una tasa de mutación mucho más rápida que el ADNmt, inclusive que genes nucleares (Jarne y Lagoda, 1996; Ellegren, 2000). Se identificó en 5 loci de microsatélites desviación del equilibrio de Hardy Weinberg en *A. diazi* atribuido a una deficiencia de heterocigocis por procesos de endogamia ($F_{is}=0.141$) (Kimura y Crow, 1963), lo que sugiere que si ha existido flujo génico posterior al aislamiento entre *A. diazi* y *A. meeki* ocurrió con baja intensidad pues no afectó la diversidad genética actual. Sin embargo, se esperaría una mayor diversidad de haplotipos únicos y mayores distancias genéticas a través del gen *Cytb*, cuyos resultados no son congruentes con dicha hipótesis. Otro resultado que

contrasta dicha hipótesis es la tasa de migración por generación no significativa entre ambas especies en ningún periodo de tiempo a través de los análisis de coalescencia tanto con *Cytb* como en combinación con los microsatélites. Por lo tanto, se concluye que *A. diazi* no es producto de un proceso de hibridación con *A. meeki*.

La proporción de individuos de *A. diazi* y *A. meeki* asignados a *A. catarinae* es alta (~0.3-0.5). El nivel de estructura genética de *A. diazi* respecto a *A. catarinae* es bajo pero mayor que con *A. meeki* ($F_{st}=0.133$). Las distancias genéticas entre *A. diazi* y *A. catarinae* y la diversidad genética (nula en el caso de *A. catarinae*) sugieren que el proceso de aislamiento se llevó a cabo recientemente causando importantes cambios demográficos (Kimura, 1969; Frankham, 1996; Montgomery *et al.* 2000; Kalinowski y Waples, 2002; Leffler *et al.* 2012) tomando en cuenta que sobre estas poblaciones sólo actúa la mutación y la deriva. Sin embargo, entre *A. diazi* y *A. catarinae* no comparten ningún haplotipo, esta última teniendo un único haplotipo de *Cytb* tampoco compartido con *A. meeki*. Se detectó una desviación significativa del equilibrio de Hardy Weinberg en *A. catarinae*, también atribuible a la deficiencia de heterocigotos por endogamia ($F_{is}=0.151$) en al menos 4 loci de microsatélites. No se observó tasa de migración significativa entre *A. diazi* y *A. catarinae* y tampoco entre *A. meeki* y *A. catarinae*, por lo que se descarta su flujo génico posterior a su separación (Wang y Whitlock, 2003) y se concluye que la historia evolutiva del complejo *A. diazi* no tiene relación con procesos de hibridación.

Los resultados antes mencionados son congruentes con los encontrados en la especie de goodeido *Alloophorus robustus* a través del gen *Cytb* (Domínguez-Domínguez, 2008), en el que se observó una estrecha relación entre la población de dicha especie en Zirahuén con la de Pátzcuaro ($\overline{Dp}=0.11\%$), se comparten haplotipos y poseen un nivel de diferenciación genética menor en este marcador ($\Phi_{st}=0.1$) al estimado en este estudio ($\Phi_{st}=0.350$). También se determinó que estas poblaciones están más relacionadas filogenéticamente con las poblaciones de la cuenca de Zacapu y Cuitzeo que con la subcuenca del río Cupatitzio, teniendo con esta última una distancia genética de $\overline{Dp}=1.06\%$ y un nivel de estructura genética de $\Phi_{st}=0.827$. La población de *Alloophorus robustus* del río Cupatitzio sólo posee un haplotipo de *Cytb* y no es

compartido con las poblaciones de Zirahuén y Pátzcuaro como ocurre en el caso de *Allotoca catarinae*. Por lo tanto las poblaciones de *Allophorus robustus* del lago de Pátzcuaro, Zirahuén y el río Cupatitzio como el complejo *Allotoca diazi*, pudieron estar sometidos a los mismos procesos de aislamiento que configuraran su actual distribución.

El rol de la selección sexual en la diversificación de diferentes grupos de animales ha sido extensamente reconocido inclusive en los peces (Lande, 1982; Seehausen and van-Alphen, 1999; Irwin *et al.* 2001; Panhuis *et al.* 2001; Kocher, 2004; Salzbruger, 2009; Wagner *et al.* 2012). La selección sexual tiene el potencial de producir una rápida divergencia entre las poblaciones, predispuesto a generar aislamiento reproductivo a causa de sus efectos indirectos en rasgos involucrados en el reconocimiento de la pareja (Panhuis *et al.* 2001; Labonne *et al.* 2010; Bonduriansky; 2011). En suma, promueve la divergencia por alopatría en lugar que por simpatría (Price, 1998; Via, 2001; Ritchie, 2007). En la familia Goodeidae, se ha estimado la tasa de especiación y al mismo tiempo se asoció esta tasa a la selección sexual (Ritchie *et al.* 2005). Se encontró que no tiene influencia significativa la elección de pareja para la reproducción en el proceso de diversificación de la familia, puesto que no hay numero de especies ancestrales significativa. Además soportó que la familia tuvo una radiación muy reciente y rápida influenciada por la innovación del viviparismo, siendo los procesos de vicarianza y radiación adaptativa los factores más determinantes en los procesos de diversificación. La tasa de especiación de Goodeidos no ha sido constante y ha tenido mayor número de extinciones recientemente estimando que al menos un linaje evolutivo se forma como mínimo en 25,000 años. Dado esto, se esperaría que si la desconexión de las áreas en que habitan *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* fuera lo suficientemente antiguas (superiores a 25,000 años), el complejo *A. diazi* mostrarían una marcada estructura genética, inclusive, una marcada divergencia genética, lo cual no es soportado en el presente trabajo. En cambio, si la variación de la tasa de mutación fuera más acelerada en *A. catarinae* comparación de la de *A. meeki* y *A. diazi*, se esperaría mayor diversidad genética y altas divergencias respecto de las mismas (Lynch, 2010), más sin embargo, se observa nula diversidad genética.

Actualmente no existe una conexión física entre los cuerpos que habitan las tres especies ni tampoco hay evidencia de una conexión secundaria de los cuerpos de agua. Por lo que lo descrito anteriormente descarta completamente el flujo génico posterior al aislamiento de las tres especies. Los resultados obtenidos descartan también las hipótesis que involucran eventos de hibridación tras un evento de especiación en el pasado. De acuerdo a la información genética recabada, los resultados obtenidos sólo son congruentes sólo con la hipótesis de especiación incipiente, por lo que podemos considerar a *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* son evidencia de un complejo de linajes incompletos que se han separado pero que aún no pasa el tiempo suficiente para que diverjan genéticamente (Maddison, 1997; Felsenstein, 2004; Maddison y Knowles, 2006; Edwards, 2009) y que es causado por la inherente estocasticidad de los procesos genealógicos de las poblaciones (Kubatko y Degnan, 2007; Wu, 2011). Por lo tanto, *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* no representan linajes evolutivos independientes.

11.2 Biogeografía y Demografía Histórica de *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*

La separación del complejo *A. diazi* respecto a su ancestro común *A. zacapuensis* fue estimado para el último millón de años. Congruente con la hipótesis de Álvarez (1972) acerca de la conexión entre la cuenca de Zacapu y el lago de Pátzcuaro y la información geológica que pudieron ser los responsables de su aislamiento. Los eventos relacionados con el aislamiento del complejo *A. diazi* pudieron ser la formación de Sierra de Zirate, durante el último millón de años (De Buen, 1944) y la formación del semiescudo volcánico noroccidental en donde destaca la actividad del volcán El Bosque, proceso altamente activo durante el Pleistoceno Tardío (Robles-Camacho *et al.* 2010). De estos, el primer evento mencionado quizá sea el más importante en el aislamiento del lago de Pátzcuaro con el paleosistema del río Lerma (Fig. 9). No existe descripción clara de la posible conexión entre el lago de Pátzcuaro y la cuenca Zirahuén, pero es posible observar que, a través de la información que los niveles del lago de Pátzcuaro, la historia geológica de la región y la diversidad de peces que comparten entre sí y que es exclusivas de estas

zonas; es posible determinar la conexión y desconexión de ambos lagos así como de las poblaciones de peces. En suma, el presente trabajo aporta evidencia genética para soportar la conexión entre ambos lagos. Además aporta información suficiente para descartar la conexión física de ambos lagos con la subcuenca del río Cupatitzio en al menos el último millón de años. Por otro lado, se identificaron cambios demográficos históricos importantes en los 3 miembros del complejo *A. diazi* que soportan los eventos de aislamiento que pudieron configurar su actual distribución.

Se identificó que la diversidad genética de al menos *A. diazi* y *A. catarinae*, baja y nula respectivamente, está asociada a importantes cambios demográficos y específicamente a cuellos de botella recientes. El cuello de botella identificado en *A. diazi* se determinó por medio de los loci de microsatélites. Mientras que en *A. catarinae* el cuello de botella se identificó tanto en el gen *Cytb* y los loci de microsatélites. En ambos casos, los cuellos de botella involucrados afectaron de manera importante las poblaciones ya que promovieron la endogamia, reduciendo de la heterocigosis y por lo tanto la pérdida de la riqueza alélica (Nei *et al.* 1975; Tajima 1989, 1996; Bouzat 2010; Peery *et al.* 2012). Lo anterior describe que existieron grandes fuerzas que redujeron el tamaño efectivo poblacional de manera importante para generar cambios en la diversidad genética observada en ambos linajes incompletos (Kubatko y Degnan, 2007; Dutheil *et al.* 2009; Hobotl *et al.* 2011). Sin embargo, se identificó un cuello de botella en *A. meeki* a través de microsatélites atribuido a la pérdida rápida de diversidad alélica y no a la pérdida de heterocigosis, sin embargo la prueba por la estima de R_{st} indica que este proceso ha sido sobreestimado. La dinámica poblacional de *A. meeki* puede ser explicada por la variación entre diversidad nucleotídica y sitios segregativos por sitio ($\pi > \Theta_s$), que es interpretado como una reducción poblacional reciente, seguido de una expansión, como lo demuestra el valor estimado de $D_t = -0.86$ y valores positivos no significativos en F_s de F_u y L_i (Hudson *et al.* 1987; Tajima 1989; McDonald y Kreitman 1991; Fu y Li 1993; 1997; Hahn *et al.* 2002). Por otro lado, el tamaño efectivo poblacional histórico de *A. meeki* ($N_e = 6,700-52,400$ individuos) ha sido mayor al estimado en *A. diazi* ($N_e = 3900-17,000$ individuos) y *A. catarinae* ($N_e = 3400-19000$ individuos), lo que indica que las

fuerzas que separaron afectando su tamaño efectivo poblacional a este miembro del complejo fueron de menor intensidad.

Los cuellos de botella identificados están asociados con los eventos históricos de separación de los miembros del complejo *A. diazi*. Por un lado se determinó que el cambio en el tamaño efectivo poblacional y el evento de separación de *A. diazi* respecto a *A. meeki* ocurrió en los últimos 7,000 años, lo cual es congruente con los eventos geológicos involucrados con la separación de lago de Pátzcuaro y Zirahuén en cual inició hace 30,000-28,000 años con la formación y el colapso del volcán El Estribo al sureste del lago de Pátzcuaro y la formación del volcán La Taza al suroeste hace 8,000 años (Israde-Alcántara *et al.* 2005, Garduño-Monroy *et al.* 2009, Ortega *et al.* 2010; Vázquez *et al.* 2010). Por lo que se soporta las hipótesis de conexión y desconexión de los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén (De Buen, 1943; Álvarez, 1972; Garduño-Monroy e Israde-Alcántara, 1998; Bradbury, 2000; Moncayo *et al.* 2001; Israde-Alcántara, 2002).

La conexión entre los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén también se ve reflejada en la ictiofauna que comparten y que son nativas de dichas cuencas: *Chirostoma arge*, *Chirostoma estor* (introducida en el río Balsas), *Chirostoma patzcuaro*, de la familia Atherinopsidae; *Algansea lacustris* de la familia Cyprinidae; y *Allophorus robustus*, *Skiffia lermae*, *Allotoca dugesii* y *Goodea atripinnis*, de la familia Goodeidae (CONABIO, 2005).

El cuello de botella que sufrió *A. diazi* y la diferencia en el tamaño efectivo poblacional histórico con respecto a *A. meeki* puede ser explicado por otros factores bien documentados en conjunto con los resultados de las predicciones de nicho ecológico potencial en el pasado. En el presente estudio se observó que el clima durante el periodo Interglaciario de hace ~120,000-140,000 años correspondiente al periodo Sangamón; tanto como en el periodo del Último Máximo Glaciar de hace ~21,000, poseía las condiciones idóneas para la existencia de *Allotoca diazi* en al menos el lago de Pátzcuaro pero con diferencias significativas. Estas fluctuaciones climáticas no han sido documentadas en la región, sin embargo los registros de las fluctuaciones en el nivel del lago de Pátzcuaro durante el Holoceno están directamente asociadas al cambio climático (O'hara, 1993; Israde-Alcántara *et al.* 2002, 2005; Garduño Monroy *et al.* 2009; Vázquez *et al.* 2010) y son primordiales para entender los

cambios demográficos en *A. diazi*. El máximo nivel del lago que se ha registrado tuvo lugar en el año 1521 y fue de 2045-2050msnm el cual fue reportado otra vez hasta 1858. El nivel mínimo que ha alcanzado el lago y que ha sido registrado fue de 2027msnm en el año 350-360 d.C. (basado en el estudio microtopográfico de la isla de Jarácuaro, Fisher y Pollar, 2003, 2005) es decir, un aumento de 23m en ~2000 años. El nivel actual del lago es de 2035m.s.n.m el cual fue registrado también en 1850 y 1955 (Garduño-Monroy *et al.* 2011) y se observó que puede oscilar hasta los 2039m durante el año (Escalante *et al.* 2003). Otro evento que pudo afectar las poblaciones conocidas de *A. diazi* conformando el actual acervo genético es la posible ocurrencia de un tsunami, el cual se tiene registro de este para el año 1858 que pudo haber sido causado por el colapso del flanco suroeste de la isla de Janitzio, contribuyendo al rápido aumento del nivel del lago (Fig. 24).

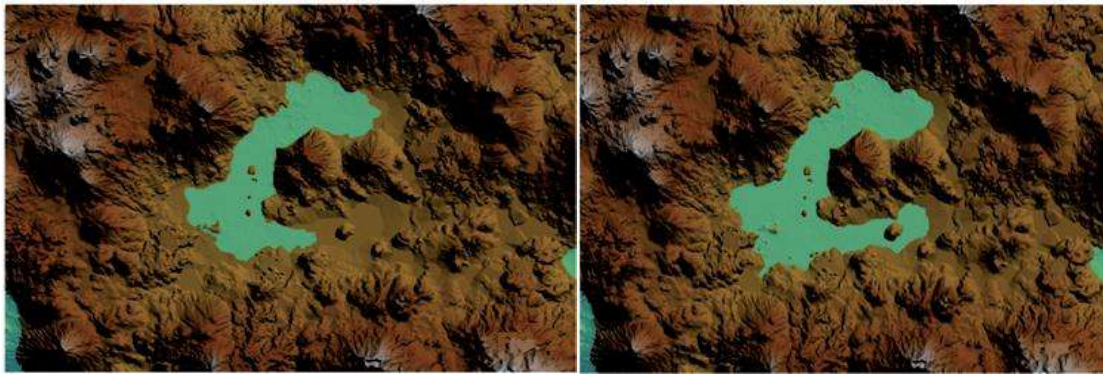


Figura 24. Nivel del lago de Pátzcuaro en el año 1521 (Izquierda) y 1850 (Derecha). Tomado de Garduño-Monroy *et al.* 2011.

Usando información palinológica, se han datado eventos de cambio climático desde los últimos 48,000 años (Watts y Bradbury, 1982, Bradbury; 2000). Además se sugirió que la agricultura moderna incrementó la formación de pantanos y el depósito de grandes cantidades de sedimentos en el lago. Se había registrado al menos 2 periodos de erosión hasta el año 1989 (Street-Parrot *et al.*) que fueron fechados para el periodo Preclásico con la introducción del cultivo del maíz (~3500 años) y el segundo durante el periodo Clásico-Colonial (~900-1650 años d.C.) producido por la expansión de la agricultura y la tala. Aunque el cambio climático ha tenido algún control sobre el nivel del lago, no se puede descartar la actividad tectónica y del hombre (O'hara, 1993; 1994). Sin embargo, todos los cambios del nivel del lago de los que se tiene

evidencia coinciden con eventos de cambios climáticos de México (O'hara y Metcalfe, 1995; Newton *et al.* 2005). Otros dos periodos de erosión fueron sugeridos durante los periodos de los años 120-775 d.C. y 1520-1960 d.C. En contraste, se encontró que en realidad fue un periodo estable al menos desde el año 776 d.C. al 1520 d.C. (Fisher *et al.* 2003).

Lo anterior sugiere entonces que las variaciones climáticas y la actividad humana tras la separación de *A. meeki* han jugado un papel importante en la configuración genética y demográfica de *A. diazi*. Cabe notar que los análisis de nicho ecológico en el pasado hacen un gran aporte en los estudios filogeográficos, en este caso podemos inferir que la disponibilidad de nichos potenciales esta relacionada positivamente con el tamaño efectivo poblacional de *A. diazi* y por lo tanto los procesos como el equilibrio mutación-deriva se ven afectados (Lacy, 1987; Whitlock *et al.* 2004; Desai y Fisher, 2007).

Otra evidencia genética de lo anterior es el patrón de desequilibrio de ligamiento detectado en *A. diazi* puede ser una evidencia más de los fenómenos climáticos antes descritos ya que nos puede proporcionar información importante de la demografía histórica (Voight *et al.* 2005; Brito y Edwards, 2008) y pueden distinguirse por diferentes causas que son soportadas con la información genética recabada:

- Deriva Genética
- Mutación Reciente
- Migración Reciente
- Reducción en el Tamaño poblacional
- Impedimento de Recombinación
- Endogamia

La migración reciente no ha sido soportada, ya que no se obtuvo tasa de migración significativa entre *A. diazi* y el resto de los miembros del complejo.

En conclusión, *A. diazi* y *A. meeki* se han separado de manera natural por eventos geológicos en los últimos 30,000 años y quizá finalizó su aislamiento hace 8,000 años. Las fluctuaciones climáticas y la actividad humana durante el Holoceno han afectado fuertemente las poblaciones de *A. diazi*, sin embargo, de manera menos intensa a *A. meeki*.

Los tiempos de divergencia y separación física de *A. catarinae* respecto de *A. diazi* y *A. meeki* se calculó en 8,000-700 años, siendo con mayor probabilidad hace 1800 años (punto más alto en la curva de la figura 19). Sin embargo no corresponde a ningún evento geológico registrado en la franja que separa el Corredor Tarasco de la Depresión del Balsas. De hecho no es congruente con la formación de la Depresión del Balsas (~99-140MA) ni con el periodo de formación de la cuenca del río Cupatitzio (~30MA) (López-Ramos, 1981; Ferrari *et al.* 2002; Gómez-Tuena *et al.* 2005; Garduño-Monroy, 2005). El cuello de botella identificado para los últimos 50,000 años (por el gen *Cytb*) y 8,000 años (por loci de microsatélites) tampoco es congruente con los eventos geológicos y climáticos más recientes y más importantes de los que se tiene registro en la región del río Cupatitzio como el origen (0.793 ± 0.022 MA) y colapso ($0.261-0.238$ MA) del volcán Tancítaro (Ownby *et al.* 2007; Morelli *et al.* 2010). La información climática del pasado y los modelos de nicho ecológico de esta especie soporta que la región del Balsas y el Corredor Tarasco eran regiones climáticamente distintas y que no existían condiciones idóneas para que *A. diazi* o *A. meeki* habitaran el río Cupatitzio. Por lo que no existe evidencia geológica, climática o biológica que soporte la idea de la conexión entre el río Cupatitzio los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén. Del mismo modo, la actual distribución de *Allotoca catarinae* no puede ser explicada por el mismo tipo de eventos.

Allotoca catarinae es la única especie en la cual se detectaron cuellos de botella en varios modelos de evolución. Estos cuellos de botella se deben en todos los casos a la deficiencia de heterocigotos ($F_{is}=0.151$), lo que sugiere un alto grado de endogamia en las poblaciones de *A. catarinae* (Nei *et al.* 1975; Frakham, 1995; Amos y Harwood; 1998; Kirkpatrick y Jarne, 2000; Hale y Briskie 2007). Este aislamiento ha causado una rápida fijación de un único haplotipo de *Cytb* en sus poblaciones a diferencia de *A. diazi* y *A. meeki*. Sin embargo, el hecho de que este haplotipo no sea compartido es sumamente complejo, fenómeno únicamente registrado de igual forma en la población *Allophorus robustus* en el río Cupatitzio (Domínguez-Domínguez, 2008). El único haplotipo de *Allophorus robustus* está más relacionado filogenéticamente con los haplotipos de las poblaciones de la Luz y el Duero en el río Duero; Bajo Lerma, que con los haplotipos de Zirahuén y Pátzcuaro. En

este caso se concluyó que la población de *Allophorus robustus* del río Cupatitzio pudo ser producto de una introducción mediada por el hombre.

No se pudo determinar de qué población proviene *Allotoca catarinae*, si de *A. diazi* o de *A. meeki* ya que no poseen la misma proporción de individuos asignados a *A. catarinae*, poseen relativamente el mismo nivel de diferenciación genética y en consecuencia el mismo tiempo de divergencia. Por lo que la presencia de un único haplotipo de *Cytb* en *A. catarinae* y que no es compartido con los otros miembros del complejo puede ser explicado por la pérdida de diversidad genética (Wahl *et al.* 2002; Heffernan y Wahl, 2002; Peacock *et al.* 2009). Es decir, posiblemente el haplotipo de *Cytb* de *A. catarinae* corresponde a un haplotipo ancestral que se ha perdido por deriva en *A. diazi* y *A. meeki* o se encontraba en la población posiblemente extirpadas del lago de Pátzcuaro y Zirahuén.

Tampoco se comparte gran número de especies entre el río Cupatitzio y los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén. De hecho sólo *Chirostoma estor* (aunque considerado introducido en el balsas) es una de las especies nativas que se comparte. Mientras que especies nativas del río balsas como *Atherinella balsana* de la familia Atherinopsidae, *Ciclasoma istlanum* de la familia Cichlidae, *Hynopsis boucardi* de la familia Cyprinidae, *Ilyodon whitei* de la familia Goodeidae, *Ictalurus balsanus* de la familia Ictaluridae, *Poecilia reticulata* y *Poeciliopsis balsas* de la familia Poeciilidae, no tienen ninguna relación con los lagos de Zirahuén y Pátzcuaro (CONABIO, 2005). Lo anterior expuesto: la nula evidencia geológica y climática de la conexión física entre el río Cupatitzio y los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén, la evidencia genética de *Allophorus robustus* (Domínguez-Domínguez, 2008) y las estrechas relaciones genéticas y morfológicas reportadas en el presente trabajo y en estudios anteriores (Regan, 1906-1908; Hubbs, 1926, 1932, Hubbs y Turner 1939; De Buen, 1942; Álvarez, 1959; Hieronimus, 1995; Meyer *et al.* 2001), sugieren que *Allotoca catarinae* y su actual distribución no es producto de un proceso natural.

Dado esto, los eventos antropogénicos más relevantes en la región de los lago de Pátzcuaro y Zirahuén, y el río Cupatitzio, son congruentes con tiempos de divergencia y separación física estimados en el presente trabajo, por lo tanto, la historia biogeográfica de *A. catarinae* ha sido configurada

posiblemente por un efecto fundador mediado por el hombre durante los últimos 1,000 años (De Mendoza, 1540; Goggin, 1943; Pérez de los Reyes, 1980; Williams y Weigand, 1996; Roskamp, 1998; Guzmán *et al.* 2001; Bravo *et al.* 2009; Pearlstein, 2009, 2012), siendo el fenómeno responsable de la no clara divergencia genética respecto a *A. diazi* y *A. meeki* por ser un evento tan reciente (Kinziger *et al.* 2011, Habel y Zachos, 2012). Esta información también contrasta la hipótesis biogeográfica propuesta por Álvarez (1972) en relación a la conexión entre el río Cupatitzio y los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén.

El efecto fundador son las consecuencias derivadas de la formación de una nueva población de una especie a partir de un número reducido de la misma (Whittaker y Fernández-Palacios, 2007). El efecto fundador también ha sido considerado como fundamental para estimular la divergencia genética que con el tiempo conduce a especiación cladogenética y radiación adaptativa (Templeton, 1980; Gavrilets *et al.* 1996; Templeton, 2008). En contraste, un modo alternativo de especiación después de un efecto fundador es la anagénesis, donde el hábitat de la nueva población mantiene relativamente las mismas condiciones ambientales que la población origen, siendo esta nueva área una zona en la que la selección se mantiene uniforme (estabilizadora) y la radiación adaptativa no actúa en gran manera (Stuessy *et al.* 2012) (Fig. 25). El tiempo es el factor determinante para la formación de un nuevo linaje evolutivo independiente, sin embargo, entre más antiguo sea el efecto fundador menos detectable será, pues habrá actuado la deriva genética durante más tiempo. En suma, se ha demostrado que la baja diversidad genética encontrada en las nuevas poblaciones tras un efecto fundador muy reciente, está mayoritariamente cuando es mediado por el hombre, por las fluctuaciones climáticas recientes y por impacto ambiental de las actividades humanas (Melbourne y Hastings, 2008; Agudo *et al.* 2010; Habel y Zachos, 2012).

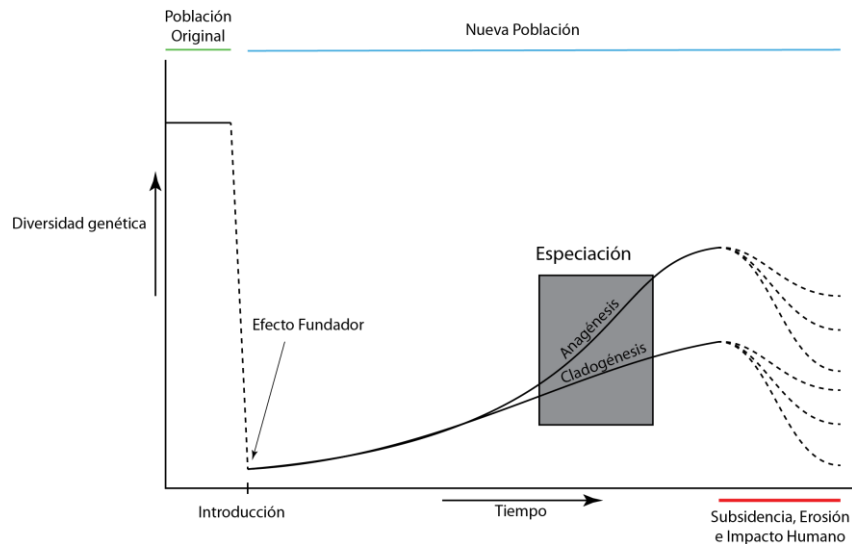


Figura 25. Variación de la diversidad genética tras un efecto fundador y pérdida de la variación genética como consecuencia de las alteraciones del hábitat. Tomado de Stuessy *et al.* 2012 y modificado en el presente trabajo.

Se sabe que el hombre ocupó la región del lago de Zirahuén causando un gran impacto durante los últimos 2,300 años, incrementando su explotación durante el siglo XVI y XVII tras la aparición de la industria en la región, y con el máximo pico desde los últimos 50 años (Bravo *et al.* 2009). Existe evidencia de que una de las actividades principales de los asentamientos de la cultura P'urhépecha era la pesca, de hecho en cuanto al aprovechamiento lacustre no era de maíz y verduras principalmente, sino de peces, tortugas, ajolotes, almejas, tule, etc. También existe registro de que los peces del lago de Pátzcuaro tenían importancia simbólica pues fueron encontradas ofrendas en tumbas en el sitio arqueológico de Uricho, localizado al suroeste del lago de Pátzcuaro. Estas ofrendas de peces datan de los periodos Clásico Tardío y Epiclásico (~500-900 d.C.). Aunque se dice que los peces utilizados pertenecían a la especie *Goodea atripinnis*, no se descarta que fuesen de otras especies incluyendo *Allotoca diazi*, además se asume que dicha tradición podría cambiar con los años sustituyendo la especie utilizada. Lo que sugiere que la diversidad íctica jugaba un papel importante en el desarrollo económico y cultural de la población P'urhépecha (Williams y Weigand, 1996; Guzmán *et al.* 2001).

Existe evidencia de los asentamientos P'urhépechas en la subcuenca del río Cupatitzio y en la cuenca del río Balsas-Tepalcatepec. La posible expansión del imperio P'urhépecha se dio durante el segundo periodo y establecimiento

de este durante el tercer periodo, es decir, durante los años 1400 (segundo periodo) y 1450 a 1530 (tercer periodo). Durante dichos periodos se llevaron las conquistas hacia el sur de Pátzcuaro y hasta la región de Colima, las cuales son denominadas “Rutas de Conquista”. Los asentamientos de los que se tiene registro tras estos periodos de conquista van desde la región del río La Palma, en la cuenca del lago Zirahuén, hasta la región del río Marqués. Sin embargo los primeros grupos que se pudieron asentar en la región de Uruapan y sur del mismo, fueron los “isleños”, grupo social aliado de los Chichimecas, grupo de pueblos indígenas “Nahua” que habitaban el centro norte, conformado por guerreros, cazadores y recolectores que no se podría descartar que ellos desde ese entonces tuvieron importante influencia en el manejo de los recursos acuícolas. El proceso de conquista por la cultura P’urhèpecha se llevó a cabo alrededor del año 1350 durante la formación del imperio, estableciendo nuevos pueblos (De Mendoza, 1540; Goggin, 1943; Pérez de los Reyes, 1980; Roskamp, 1998; Pearlstean; 2012).

11.3 Implicaciones Taxonómicas

Dada la información genética, morfológica, biológica y evolutiva del complejo *A. diazi*, dicho complejo conforma un único grupo genético con baja o nula estructura genética ya que se han separado recientemente. Considerarlas como linajes evolutivos independientes o especies como tal, implicaría la implementación de un concepto de especie. Esta decisión tiene importantes alcances y quizá el más grande es el de la conservación del complejo y la zona en que habitan.

Si se toma el concepto biológico de especie el cual dice que una especie es un grupo de individuos fértiles entre sí (real o potencial) y aislados del entrecruzamiento con otros grupos similares por incompatibilidades fisiológicas (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942), el complejo *A. diazi* conformaría una única especie con 7 poblaciones; en el lago de Pátzcuaro, la cuenca de Zirahuén, y cuatro distribuidas en la subcuenca del río Cupatitzio, las tres regiones aisladas actualmente entre sí.

El concepto filogenético de especie se define como un grupo basal de organismos diagnosticablemente diferente de otro similar, dentro del cual hay un patrón de ascendencia-descendencia, siendo entonces el grupo monofilético más pequeño con ascendencia común (Wiley, 1978). Con la información obtenida del *Cytb* y la débil estructuración genética encontrada, no es posible identificar tres grupos monofilético, bajo este concepto *A. diazi* y *A. meeki* representan una especie, mientras que *A. catarinae* otra.

Como se puede observar, los conflictos entre conceptos de especie aparecen básicamente al definir criterios operativos para identificar estas taxa aún cuando se utilizan conceptos de índole evolutiva. Bajo estos conceptos, el interés se centra en la identificación de grupos monofiléticos y determinar patrones y procesos de especiación. Dada las dificultades en la aplicación de un concepto de especie, el concepto cohesivo de especie (Templeton 1989) intenta sintetizar los conceptos con un contexto evolutivo, el cual menciona que una especie es la unidad más inclusiva, que presenta cohesión fenotípica y genotípica, mantenida por mecanismos de cohesión como el flujo génico y los factores que determinan el nicho ecológico, es decir, mecanismos que mantienen y promueven el parentesco genético (intercambiabilidad genética) y el uso de un mismo nicho fundamental (intercambiabilidad demográfica o ecológica). Para inferir un suceso de especiación bajo este concepto se deben rechazar estadísticamente tres hipótesis nulas: las poblaciones objeto de estudio forman un único linaje evolutivo, existe intercambiabilidad genética y existe intercambiabilidad ecológica o demográfica (Perfectti, 2002).

Tomando en cuenta el concepto cohesivo de especie podemos concluir que el complejo *A. diazi* está conformado por una única especie conservándose la clasificación taxonómica de la primera especie descrita como *Allotoca diazi* (Meek, 1902) y la que posiblemente dio origen de manera natural al menos a *A. meeki*. Aunque cada miembro en términos evolutivos se considere como linajes incompletos o especies incipientes y se encuentran aisladas entre sí en regiones con condiciones climáticas distintas que no permiten la intercambiabilidad genética, ecológica y demográfica de la especie; en un futuro los tres miembros formarán linajes evolutivos independientes. Por un lado, *A. catarinae* debe considerarse taxonómicamente como una introducción del hombre de *A. diazi* en la subcuenca del río Cupatitzio pues de lo contrario

su clasificación se ajustaría al sistema artificial de clasificación (Doolittle, 1999). Mientras que *A. meeki* debe ser considerada como una especie incipiente o bien subespecie de *A. diazi* debido a que ha sido producto de procesos naturales por lo que se sugiere su nomenclatura como *Allotoca diazi meeki* puesto posee haplotipos únicos tanto en su genoma nuclear como mitocondrial originados tras su separación pero aún poseen la misma integridad genética que *A. diazi* (Cracraft, 1989; De Queiroz, 2007; Mallet, 2007). Por lo tanto se sugiere la clasificación del complejo *A. diazi* como una única especie *Allotoca diazi* con dos subespecies: *Allotoca diazi diazi* (población del lago de Pátzcuaro) y *Allotoca diazi meeki* (población del lago de Zirahuén) y una población introducida artificialmente de *A. diazi* en la subcuenca del río Cupatitzio sin conocer de qué subespecie proviene.

11.4 Implicaciones de Conservación

El complejo *A. diazi* o bien la especie *A. diazi* en las regiones que habita necesita especial atención y es de gran importancia su conservación y la aplicación de programas eficientes de los mismos inmediatamente puesto que se trata de especies endémicas de Michoacán y de México, especies de importancia para el estudio en materia de evolución, adaptación, de importancia biológica y comercial puesto que algunas de ellas son utilizadas para el consumo humano actualmente, además de habitar regiones de importancia biológica, económica y cultural a nivel estatal y nacional.

Se identificaron dos OCUs correspondientes a las poblaciones naturales de las subespecies *A. diazi diazi* y *A. diazi meeki*. Fuentes no oficiales nombran al lago de Pátzcuaro como Área Natural Protegida (ANP), sin embargo, no está reconocido como tal. De hecho sólo el volcán de El Estribo está incluido oficialmente como ANP. Por otro lado, en el año 2009 se exigió decretar el lago de Zirahuén como ANP, sin embargo no se ha incluido como tal. Dicho cuerpo de agua ha sido altamente afectado por la introducción de especies exóticas, extirpando inclusive a la población de *A. meeki* del baso lacustre. La región de Opopeo no se ha tomado en cuenta para su inclusión, pero se sugiere que lo

sea lo más pronto posible para la conservación de los recursos acuícolas que aún posee.

Lo anterior habla de la inminente necesidad de crear eficientes programas estratégicos que ayuden a detener la degradación de estas regiones y a conservar los recursos naturales de los que depende biológica y económicamente una región sumamente importante en el país.

Se sugiere la inmediata inclusión de *A. meeki* en la lista de especies amenazadas o en peligro de extinción por los siguientes criterios: Sólo posee una población actual, es vulnerable a la introducción de especies exóticas, los registros en el presente trabajo muestran una reducción en el tamaño poblacional actual, se encuentra en una región con alto impacto humano y posiblemente sea vulnerable al cambio climático como se observó en este trabajo. La contaminación y la introducción de especies exóticas en Opopeo ha desplazado actualmente a *A. meeki*, refugiándose en un pequeño canal del río la Palma que sirve de riego y descarga de aguas residuales.

Los modelos de nicho ecológico en el futuro son una herramienta muy importante en materia de conservación y manejo de la biodiversidad. El análisis llevado a cabo en el presente trabajo muestra que aún si se aplicaran eficientes estrategias de desarrollo económico, social y medio ambiental, que no incluyeran grandes cambios sino que al menos frenaran el impacto humano en el cambio climático y manteniendo estable las condiciones a partir de la segunda mitad del siglo, no se podrían mantener las condiciones idóneas para la supervivencia de la especie. En las próximas décadas se predice un incremento rápido de la temperatura anual ($\sim 1^{\circ}\text{C}$), reduciendo de manera importante las áreas potenciales del complejo *A. diazi* según modelos a futuro, comprometiendo la supervivencia de la ictiofauna de las áreas de estudio de este trabajo, de hecho, la predicción para el año 2020 no genera un área potencial para la presencia de *A. catarinae* en río Cupatitzio y se mantienen reducidas durante todo el siglo por lo que puede esperarse que estén en grave peligro de extinción. El área potencial para *A. meeki* se modifica situándose en otras regiones durante la próxima década. Mientras que para el 2050 se predice un cambio completo en el área potencial de *A. meeki*, áreas situadas en lejanas que no permitirían la dispersión de la especie. Para el año 2080 se predice una reducción nuevamente de las áreas potenciales por el incremento

aunque lento pero continuo. De igual manera ocurre con *A. diazi*, donde para el año 2020 se espera una gran reducción en su área potencial para habitar, mientras que para el 2050 se espera un cambio brusco de área potencial, extensa pero fuera de las posibilidades de dispersión de la especie. Para el 2080 se ve reducida nuevamente el área potencial de *A. diazi* siendo sólo un área potencial el lago de Pátzcuaro.

Lo anterior sugiere que los programas que se deben aplicar para la conservación y manejo de recursos naturales deben ser más eficientes y no sólo frenar el impacto humano en el ambiente, sino aplicar programas de restauración ecológica.

Estos escenarios podrían ser extrapolados a distintos grupos de organismos y es posible que se vean afectados de igual manera. A su vez, se considera que este tipo de análisis son eficientes para la formación de criterios de conservación y que dentro del presente trabajo deben ser considerados para la aplicación de programas futuros o actuales. También podrían ser usados para la explicación de la dinámica poblacional y genética de las poblaciones en el futuro en condiciones antropogénicas y económicas distintas y contribuyen de manera importante en el estudio de la historia evolutiva de los organismos.

Es indispensable determinar el impacto ecológico de la translocación de *A. diazi* en la subcuenca del río Cupatitzio pues es de gran importancia para la conservación, puesto que permite la correcta aplicación de estrategias de conservación de otras especies y manejo de recursos en la región. Su evaluación implicaría considerarla como una población introducida naturalizada invasora o no invasora (Zhan *et al.* 2012), es decir, si su introducción causó su proliferación, extendiéndose más allá de sus límites ecológicos, induciendo con ello cambios que amenazan los ecosistemas, el hábitat u otras especies, o bien, simplemente lograron establecerse al romper las barreras bióticas y abióticas que se opusieron a su supervivencia y sin afectar la integridad de manera importante del nuevo hábitat y sus especies. Lo anterior se sugiere puesto que la translocación de especies tiene alto riesgo de convertir a una especie nativa en especie invasora y es imprescindible en determinar los costos y beneficios de ello (Ricciardi y Simberloff, 2009; Seddon, 2010; Erfmeier y Bruelheide, 2010; Thomas, 2011).

Actualmente sólo se reconoce oficialmente al Parque Urbano Ecológico de Uruapan como Área Natural Protegida (ANP), cuya área es de uso público dentro de los centros de población, que tiene como objetivo preservar el equilibrio de las áreas urbanas e industriales, entre las construcciones, equipamientos e instalaciones respectivas y los elementos naturales.

Ni la presa Santa Catarina o Caltzontzin, El Sauco y ni la región de las “Yacatas”, están consideradas ANP, las cuales poseen actualmente gran proporción de las poblaciones de peces del río Cupatitzio incluyendo a *A. diazi*. Las primeras dos regiones se encuentran dentro del núcleo urbano y se ven altamente afectadas por el hombre. La región de las “Yacatas” y la presa Cupatitzio sufren un impacto enorme por la descarga de aguas residuales y la introducción de especies exóticas.

Lo anterior es evidencia de que se debe prestar especial atención a la subcuenca del río Cupatitzio y al impacto de la introducción de especies ya que sus poblaciones de peces se encuentran altamente vulnerables.

XII. Conclusiones

- El complejo *Allotoca diazi* está conformado por tres grupos genéticos poco diferenciados actualmente conocidos como *A. diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.
- El complejo *A. diazi* representa una única especie en la que se sugiere se consideren dos subespecies *Allotoca diazi diazi* y *A. diazi meeki* endémicas de los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén respectivamente, y una población introducida por el hombre en la subcuenca del río Cupatitzio.
- La historia evolutiva de las actualmente consideradas como *A. diazi* y *A. meeki* está vinculada a la conexión y desconexión del lago de Pátzcuaro y Zirahuén en los últimos 30,000 años.
- Los miembros del complejo *A. diazi* poseen baja o nula estructura genética y han sufrido importantes cambios demográficos a través del tiempo debido a su separación física, las fluctuaciones climáticas y el impacto humano.
- El complejo *A. diazi* posee baja diversidad genética y altos niveles de endogamia que podría producir la acumulación de mutaciones deletéreas, comprometiendo la supervivencia del mismo.
- La historia evolutiva de *A. catarinae* no está vinculada a la actividad tectovolcánica y climática de la región.
- La actual distribución de *A. catarinae* se atribuye a un efecto fundador mediado por el hombre ocurrido en los últimos 1,000 años.
- La cultura P'urhépecha a jugado un importante rol en la actual configuración del área de distribución del complejo *A. diazi*.

- No existe evidencia de la conexión física entre la subcuenca del río Cupatitzio y los lagos de Zirahuén y Patzcuaro. Por lo que al menos han estado separados por 140,000 años.
- Los principales eventos geológicos que promovieron el aislamiento de *A. diazi* y *A. meeki* son la formación y actividad del volcán El Estribo (~28,000 años) y La Taza (~8,000 años), al sur del lago de Pátzcuaro y son soportados por los fechamientos obtenidos con la información genética del presente trabajo.
- La hipótesis de Álvarez (1972) no se ajusta completamente al patrón biogeográfico del complejo *A. diazi*. Sólo es congruente con las conexiones que existieron entre el lago de Pátzcuaro, Zirahuén y la cuenca de Zacapu, pero no en relación a la conexión de la subcuenca del río cupatitzio ni los tiempos de separación (1MA-0.7MA).
- La hipótesis de De Buen (1943) es congruente al patrón filogeográfico observado entre *A. diazi* y *A. meeki* y su relación con la cuenca del río Lerma.
- Las fuertes alteraciones ambientales durante el Holoceno (fluctuaciones climáticas, cambio de uso de suelo, desecación, tala, introducción de especies exóticas, etc.) ha tenido y sigue teniendo gran impacto en las poblaciones del complejo *A. diazi*, reduciendo sus poblaciones, su variabilidad genética y poniendo en riesgo su supervivencia.
- Las tres regiones donde se distribuye el complejo *A. diazi* poseen condiciones completamente distintas pero sólo dos deben considerarse Unidades Operativas de Conservación. Se debe determinar el impacto de la introducción de *A. diazi* en el río Cupatitzio y estimar los costes y beneficios de conservar una especie translocada.

- Las áreas en las que se distribuye *A. diazi diazi* y *A. diazi diazi* deben de tener especial atención y aplicar inmediatamente estrategias eficientes de conservación y manejo a largo plazo. Cada una de estas regiones debe estar oficialmente decretadas como Áreas Naturales Protegidas ya que son regiones de alta abundancia y riqueza de especies, además de alta riqueza de endemismos.
- Los programas de conservación y manejo deben incluir la recuperación de áreas específicas que promuevan el establecimiento eficiente de las poblaciones de peces así como de restauración ecológica.

XIII. Datos Complementarios

Tabla C1. Frecuencias alélicas por loci para las *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae*.

Locus	Alelo	<i>A. diazi</i>	<i>A. meeki</i>	<i>A. catarinae</i>
XC18	519	0.18919	0.02778	--
	521	0.02703	0.13889	0.02439
	523	--	0.05556	--
	525	--	0.02778	--
	541	0.13514	--	--
	549	0.01351	0.02778	--
	551	0.02703	0.19444	--
	555	--	--	0.28049
	563	--	--	0.04878
	571	0.02703	0.02778	--
	573	0.16216	--	0.0122
	579	--	0.08333	0.03659
	581	--	0.19444	0.03659
	583	--	--	0.06098
	585	--	0.11111	0.0122
	587	--	--	0.02439
	589	--	--	0.09756
	591	--	--	0.0122
	595	0.18919	--	0.04878
	597	--	--	0.06098
	601	--	--	0.06098
	605	--	0.05556	--
	607	0.04054	0.02778	0.07317
	611	-	--	0.08537
	613	0.01351	--	--
615	0.17568	--	0.0122	
619	--	--	0.0122	
625	--	0.02778	--	
ZT1.6	240	--	--	0.36585
	242	0.02703	--	0.0122
	244	--	0.11111	--
	248	0.01351	0.02778	0.23171
	252	0.28378	0.16667	0.2561
	254	--	--	0.12195
	258	0.04054	0.05556	--
	264	0.10811	0.02778	--
	266	0	0.11111	--
	268	0.06757	0.08333	--
	270	--	0.02778	--
	272	0.01351	--	--
	274	--	0.02778	--
	276	0.36486	--	0.0122
	278	0.01351	0.05556	--
	280	0.02703	--	--
	282	--	0.13889	--
	284	--	0.05556	--
	288	--	0.11111	--

Locus	Alelo	<i>A. diazi</i>	<i>A. meeki</i>	<i>A. catarinae</i>
ZT1.7	306	0.04054	--	--
	152	0.10811	--	--
	168	0.06757	--	0.06098
	172	0.2027	--	--
	176	0.06757	0.02778	0.13415
	180	0.12162	--	0.0122
	184	--	0.11111	--
	188	0.21622	0.05556	0.04878
	192	0.01351	--	0.26829
	196	--	0.13889	0.12195
	200	--	0.05556	0.12195
	204	0.06757	0.08333	0.08537
	208	--	0.05556	0.0122
	212	0.02703	0.05556	0.02439
	216	--	0.30556	0.02439
	217	--	0.02778	--
	222	0.10811	0.02778	0.03659
	224	--	0.05556	0.03659
	229	--	--	0.0122
IW196	197	0.02703	--	--
	199	--	0.02778	0.21951
	201	0.33784	0.13889	0.12195
	203	0.09459	0.11111	0.03659
	205	--	--	0.0122
	209	0.01351	0.22222	0.57317
	211	--	--	0.02439
	215	0.06757	0.08333	--
	219	--	0.05556	--
	225	0.01351	0.02778	--
	229	0.01351	0.02778	--
	231	0.35135	0.22222	0.0122
	235	--	0.08333	--
	239	0.02703	--	--
	247	0.04054	--	--
251	0.01351	--	--	
XC25	178	--	0.02778	--
	180	0.10811	--	--
	184	0.71622	0.55556	0.89024
	186	--	0.02778	--
	188	0.01351	0.02778	0.10976
	190	0.14865	0.13889	--
	192	0.01351	0.08333	--
	194	--	0.05556	--
	196	--	0.08333	--
AS2	220	0.08108	--	--
	230	--	0.16667	--
	235	--	0.22222	--
	240	0.32432	0.05556	0.31707
	245	0.21622	0.05556	0.21951
	250	--	0.05556	0.37805
	255	0.08108	0.11111	0.04878
	260	0.08108	0.19444	--

Locus	Alelo	<i>A. diazi</i>	<i>A. meeki</i>	<i>A. catarinae</i>
	265	--	0.11111	0.02439
	270	0.05405	--	0.0122
	275	0.16216	0.02778	--
ZT1.9	391	--	0.02778	--
	403	--	--	0.03659
	407	0.01351	--	--
	411	--	0.02778	0.02439
	415	--	--	0.03659
	419	--	0.02778	0.0122
	423	0.02703	--	--
	427	0.09459	--	0.12195
	431	0.01351	--	0.08537
	435	--	0.02778	0.06098
	439	0.02703	0.08333	0.07317
	443	--	0.08333	0.08537
	447	0.2027	0.19444	0.07317
	451	0.10811	0.19444	0.04878
	455	--	0.02778	0.09756
	459	0.02703	0.16667	0.02439
	463	0.04054	--	0.13415
	467	0.02703	0.02778	0.0122
	471	0.32432	0.02778	0.06098
	475	0.05405	0.02778	0.0122
	479	--	0.05556	--
	483	0.02703	--	--
	487	0.01351	--	--

XIV. Bibliografía Citada

- Acuña JO, Medina M & Zubieta T. 2006.** Hábitos alimenticios de dos especies de peces vivíparos de la Mintzita. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Allendorf FW, Luikart GH & Aitken SN. 2007.** Conservation and the Genetics of Populations. John Wiley & Sons, 632 pp.
- Álvarez VJ. 1959.** Contribución al conocimiento del género *Neophorus* (Pisces:Goodeidae). *Ciencia Mexicana*, **XIX** (1-3): 13-22.
- Agudo R, Rico C, Vilà C, Hiraldo F & Donázar J. 2010.** The role of humans in the diversification of a threatened island raptor. *BMC Evolutionary Biology*, **10**: 384.
- Álvarez VJ. 1963.** Ictiología Michoacana III. Los peces de San Juanico y Tocumbo, Mich. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, **12**: 11-138.
- Álvarez VJ. 1972.** Ictiología Michoacana V. Origen y distribución de la ictiofauna dulceacuícola michoacana. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, **19**: 155-161.
- Amos W & Harwood J. 1998.** Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **353**(1366): 177–186.
- Villaseñor-Gómez L (eds). 2005.** Anexos en: *La Biodiversidad en el estado de Michoacán: estudio de caso*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO, México.
- Aranda-Gómez JJ, Henry CD, & Luhr JF. 2000.** Evolución tectomagmática post-paleocénica de la Sierra Madre Occidental y de la porción meridional de la provincia tectónica de Cuencas y Sierras, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, **53**, 57-59.
- Arbogast BS, Edwards SV, Wakeley J, Beerli P & Slowinski JB. 2002.** Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**(1): 707–740.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders N. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst*, **18**: 489-522.
- Avise JC. 1998.** The history and purview of phylogeography: A personal reflection. *Molecular Ecology*, **7**: 371–379.
- Avise JC. 2000.** *Phylogeography*. Harvard University Press. USA.
- Ban M, Hasenaka T & Delgado-Granados H. 1992.** K-Ar ages of lavas from shield volcanoes in the Michoacan-Guanajuato volcanic field, Mexico. *Geofísica Internacional*, **31**(4): 467-473.
- Bandelt H-J, Foster P & Röhl A. 1999.** A Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**(1): 37-48.
- Barbour CD. 1973.** A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A specie flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 533-556.

- Bean TH. 1887.** Descriptions of five new species of fishes sent by Prof. A. Duges from the province of Guanajuato, Mexico. *Proc. U.S. Nat. Mus*, **10**: 370-275.
- Bean TH. 1892.** Notes of fishes collected in Mexico by Professor Duges, with descriptions of new species. *Proc. U.S. Nat. Mus*, **15**: 283-287.
- Beerli P. 1998.** Estimation of migration rates and population sizes in geographically structures populations. En Carvalho, G. Advances in (ed). *NATO-ASI workshop series*. IOS Press. Amsterdam.
- Bell GI & Jurka J. 1997.** The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *Journal of Molecular Evolution*, **44**(4): 414-421.
- Bisazza A. 1997** Sexual selection constrained by internal fertilization in the livebearing fish *Xenotoca eiseni*. *Animal Behaviour*, **54**: 1347-1355.
- Bonduriansky R. 2011.** Sexual selection and conflict as engines of ecological diversification. *The American Naturalist*, **178**: 729–745.
- Boto L & Doadrio I. 2003.** Polymorphic microsatellites in tow different species of genus *Zoogoneticus* Meek, 1902 (Goodeidae, Actynopterygii). *Molecular Ecology*, **3**: 70-72.
- Bouzat JL. 2010.** Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection, and history. Springer. *Conservation Genetics*, **11**: 463-478.
- Bradbury JP. 2000.** Limnologic history of the Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México from the past 48,000 years: impacts of the climate and man. *Paleogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **163**: 69-95.
- Bradley RD & Baker RJ. 2001.** A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, **82**(4): 960–973.
- Bravo EM, Mendoza CME & Medina OLE. 2009.** Escenarios de erosión bajo diferentes manejos agrícolas en la cuenca del lago de Zirahuén, Michoacán, México. *Investigaciones geográficas*, **68**: 73–84.
- Brito PH & Edwards SV. 2009.** Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, **135**: 439–455.
- Brown WM, George M & Wilson AC. 1979.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS*, **76**(4): 1967–1971.
- Bulmer MG. 1971.** The effect of selection on genetic variability. *American Naturalist*, **105**(943): 201–211.
- Bustamante M. 1837.** *Cyprinus viviparous*, (vulo) mexlapique. El Mosaico Mexicano. Tom. II. *Historia Natural, Ichthyologia*.
- Camarena-Magaña E. 2002.** Hábitos alimentarios de *Allotoca meeki* Álvarez, 1959 (Osteichthyes: Goodeidae) de la laguna de Opopeo, Michoacán. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. 77 pp.
- Chen C, Durand E, Forbes F & Francois O. 2007.** Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 747–756.

- Cornuet JM & Luikart G. 1997.** Description and power analysis of two test for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**: 2001-2014.
- Corona-Santiago DK, & Domínguez-Domínguez O. 2011.** Goodeids Phylogeny. In Kempkes M, Köck M & Stawikowski: Contribution to the biology and conservation of Splittfins (Goodeidae). Westarp Wissenschaften, 1ra Ed. Alemania.
- Costa JEM. 1998.** Phylogeny and classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha): a reappraisal. En Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS & Lucena CAS (eds): *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS. Porto Alegre, Brazil.
- Cracraft J. 1987.** Species concepts and the ontology of evolution. *Biology and Philosophy*, **2**(3): 329–346.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM & Wayne RK. 2000.** Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**:290-295.
- Crawford AM & Cuthbertson RP. 1996.** Mutations in sheep microsatellites. *Genome Research*. **6**: 876–879.
- De Buen F. 1942.** Una nueva especie del *Neophorus diazi* (Meek), *Anales del Instituto de Biología*, **13**(1): 342-349.
- De Buen F. 1943.** Los lagos de michoacanos. I. Caracteres generales. El lago de Zirahuén. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **4**: 211-232.
- De Buen F. 1944.** Los lagos de michoacanos. II. Páztcuaro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **5**(1-2): 99-125.
- De Alcalá FJ. 1540.** *Relación de Michoacán*. Fondo de Cultura Económica, Ed. Fondo 2000, 88.
- Desai MM & Fisher DS. 2007.** Beneficial mutation selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics*, **176**(3): 1759–1798.
- De Queiroz K. 2007.** Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, **56**(6): 879–886.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M & Freimer NB. 1994.** Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *PNAS*. **91**: 3166–3170.
- Doadrio I, Perdices A & Machordom A. 1996.** Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes*, **45**: 259-271.
- Doadrio I & Domínguez-Domínguez O. 2004.** Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome *b*, sequence data, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**: 416-430.
- Dobzhansky T. 1937.** Genetic nature of species differences. *American Naturalist*, **71**(735): 404–420.
- Domínguez-Domínguez O, Doadrio I & Pérez-Ponce de León G. 2006.** Historical biogeography of some river basins in Central Mexico evidenced by their goodeinae

freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks parsimony analysis (BPA). *Journal of Biogeography*, **33**: 1437-1447.

- Domínguez-Domínguez O & Pérez-Ponce de León G. 2007.** Los Goodeidos, peces endémicos del Centro de México. *Biodiversitas*, **75**: 12-15.
- Domínguez-Domínguez O, Boto L, Alda F, Pérez-Ponce de León G, & Doadrio I. 2007a.** Human impacts on drainages of the Mesa Central of Mexico, and its genetic effects on an endangered fish, *Zoogoneticus quitzeoensis*. *Conservation Biology*, **21**: 168-180.
- Domínguez-Domínguez O, Alda F, Pérez-Ponce de León G, García-Garitagoitia JL, & Doadrio I. 2008.** Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* (Bean, 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. *BMC Evolutionary Biology*, **8**(161): 1-19.
- Domínguez-Domínguez O. 2008.** Filogeografía de *Zoogoneticus quitzeoensis*, *Xenotoca variata* y *Allophorus robustus* (Cyprinodontiformes: Goodeidae) en el centro de México. Tesis de Doctorado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Autónoma de México.
- Domínguez-Domínguez O & Vázquez-Domínguez E. 2009.** Filogeografía: Aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*, **32**(1): 59-70.
- Domínguez-Domínguez O & Pérez-Ponce de León G. 2009.** Es la Mesa Central de México una provincia biogeográfica?: un análisis descriptivo basado en componentes bióticos dulceacuícolas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **80**: 835-852.
- Domínguez-Domínguez O, Pedraza-Lara C, Gurrola-Sánchez N, Pérez Rodríguez R, Israde-Alcántara I, Garduño-Monroy VH, Doadrio I, Pérez-Ponce de León G & Brooks DR. 2012.** Historical biogeography of the Goodeinae (Cyprinodontiforms). En Uribe-Aranzabal MC & Grier H, (eds): *Viviparous fishes II*. New Life Publications, Florida, 13-30.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B & Phybus OG. 2005.** Bayesian Coalescent Inference of past population dynamics for molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**: 1185-1192.
- Drummond AJ & Rambaut A. 2007.** Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**: 214.
- Doolittle WF. 1999.** Phylogenetic Classification and the Universal Tree. *Science*, **284**(5423): 2124–2128.
- Durand E, Jay F, Gaggiotti OE & Francois O. 2009.** Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. *Molecular Biology and Evolution*, **26**: 1963–1973.
- Dutheil JY, Ganapathy G, Hobolth A, Mailund T, Uyenoyama MK & Schierup MH. 2009.** Ancestral population genomics: the coalescent hidden Markov model approach. *Genetics*, **183**: 259–274.

- Edwards CE, Soltis DE & Soltis PS. 2008.** Using patterns of genetic structure based on microsatellite loci to test hypotheses of current hybridization, ancient hybridization and incomplete lineage sorting in *Conradina* (Lamiaceae). *Molecular Ecology*, **17**: 5157–5174.
- Edwards SV. 2008.** Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution*, **63**: 1–19.
- Ellegren, H. 2004.** Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature: Reviews of Genetics*, **5**(6): 435-445.
- Erfmeier A & Bruelheide H. 2009.** Invasibility or invasiveness? Effects of habitat, genotype, and their interaction on invasive *Rhododendron ponticum* populations. *Biological Invasions*, **12**(3): 657–676.
- Escalante M, González J, Morales R, Salcedo E & Rodríguez C. 2003.** Simulación del impacto de diversas acciones de recuperación sobre el lago de Pátzcuaro. *Yearbook IMTA*, 32-39.
- Evanno G, Regnaut S, & Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**(8): 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- Excoffier L. 2001.** Analysis of Population Subdivision. In: *Handbook of Statistical Genetics*, pp. 980–1020. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Excoffier L & Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 564-567.
- Falush D, Stephens M & Pritchard JK. 2007.** Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 574–578.
- Farías IP, Ortí G, Simpaio I, Schneider H & Meyer A. 2001.** The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The limits of Resolution for Analysing Relationship Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*, **53**: 89-103.
- Felsenstein J. 2004.** *Inferring phytogenies*. Sunderland, 644 pp.
- Ferrari L, López-Martínez M & Rosas-Elguera J. 2002.** Ignimbrite flare-up and deformation in the southern Sierra Madre Occidental, western México; Implications for the late subduction in history of Farallón plate. *Tectonics*, **21**: 1-24.
- Fisher CT, Pollard HP, Israde-Alcántara I, Garduño-Monroy VH & Banerjee SK. 2003.** A reexamination of human-induced environmental change within the Lake Pátzcuaro Basin, Michoacán, Mexico. *PNAS*, **100**(8): 4957–4962.
- Fisher CT. 2005.** Demographic and Landscape Change in the Lake Patzcuaro Basin, Mexico: Abandoning the Garden. *American Anthropologist*, **107**: 87–95.
- Frankham R. 1996.** Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*, **10**: 1500–1508.

- Freeland JR. 2005.** *Molecular ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra.
- Fu YX & Li WH. 1993.** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693–709.
- Fu YX. 1997.** Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, **147**: 915-925.
- Garduño-Monroy VH, Spinner J & Ceragioli E. 1993.** Geological and structural study of the Chapala rift state of Jalisco, México. *Geofísica Internacional*, **32**(3): 487-499.
- Garduño-Monroy VH & Israde-Alcántara I. 1998.** Existió interconexión entre los lagos de Zirahuén, Pátzcuaro y Zacapu, Mich. Un punto de vista de la evolución geológica de las depresiones lacustres. Resumen 1er. *Congreso Nacional de Limnología*. Morelia, Michoacán.
- Garduño-Monroy VH. 2005.** Descripción física y biótica: El relieve. En Villaseñor-Gómez L (eds): *La Biodiversidad en el estado de Michoacán: estudio de caso*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO, México.
- Garduño-Monroy VH, Chávez-Hernández J, Aguirre-González J, Vázquez-Rosas R, Mijares AH, Israde-Alcántara I, Hernández-Madrigal VM, Rodríguez-Pascua MA & Pérez LR. 2009.** Zonificación de los periodos naturales de oscilación superficial en la ciudad de Pátzcuaro, Mich. México, con base en microtemores y estudios paleosismología. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, **26**(3): 623-637.
- Garduño-Monroy VH, Soria-Caballero DC, Israde-Alcántara I, Madrigal-Hernández M, Rodríguez-Ramírez, A, Ostroumoc M, Rodríguez-Pascua MA, Chacon-Torres A & Mora-Chaparro JC. 2011.** Evidenci of tsunami events in the Paleolimnological record of Lake Pátzcuaro, Michoacán, Mexico. *Geofísica Internacional*, **50-2**: 147–161.
- Garman S. 1895.** The cyprinodonts. *Mem. Mus. Comp. Zool*, **19**: 1-179.
- Goggin JM. 1943.** An archaeological survey of the Río Tepalcatepec basin, Michoacán, México. *American Antiquity*, **9**: 44–58.
- Gómez-Tuena A, Orozco-Esquivel M & Ferrari L. 2005.** Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, **57**(3): 227-283.
- Graham CH, Ron SR, Santos JC, Schneider CJ & Moritz C. 2004.** Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution*, **58**: 1781–1793.
- Graham CH & Hijmans RJ. 2006.** A comparison of methods for mapping species ranges and species richness. *Global Ecology and Biogeography*. **15**: 578–587.
- Grant EC & Riddle BR. 1995.** Are the endangered springfish (*Crenichthys* Hubbs) and poolfish (*Empetrichthys* Gilbert) funfulines or goodeids: A mitochondrial DNA assessment. *Copeia* 209-212.
- Gavrilets S & Hastings A. 1996.** Founder effect speciation: a theoretical reassessment. *American Naturalist*, **147**(3): 466–491.
- Grudzien TA, White MM & Turner JB. 1992.** Biochemical systematics of the viviparous fish family Goodeidae. *J. Fish. Biol*, **40**: 801-814.

- Guisan A & Zimmermann NE. 2000.** Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological modelling*, **135**: 147-186.
- Gu X & Li WH. 1996.** A general additive distance with time-reversibility and rate variation among nucleotide sites. *PNAS*, **93**: 4671–4676.
- Guindon, S. & Gascuel O. 2003.** A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**(5): 696-704.
- Guzmán AF, Polaco ÓJ & Pollard HP. 2001.** Ofrendas de peces asociadas a entierros del Clásico-Epiclásico en Urichu, Michoacán, México. *Archaeofauna*, **10**: 149–162.
- Habel JC & Zachos FE. 2012.** Past population history versus recent population decline - founder effects in island species and their genetic signatures (R Whittaker, Ed.). *Journal of Biogeography*, **40**: 206–207.
- Hahn MW, Rausher MD & Cunningham CW. 2002.** Distinguishing between selection and population expansion in an experimental lineage of bacteriophage T7. *Genetics*, **161**: 11–20.
- Hale KA & Briskie JV. 2007.** Decreased immunocompetence in a severely bottlenecked population of an endemic New Zealand bird. *Animal Conservation*, **10**: 2–10.
- Hamill RM, Webb SA, Macías GC, Graves JA, Magurran AE & Ritchie MG. 2000** Comparison of genetic diversity at microsatellites loci in near-extinct and non-endangered species of Mexican goodeine fishes and prediction of cross-amplification within the family. *Journal of Fish Biology*, **70**(A): 16-32.
- Hardy OJ & Vekemans X. 2002.** SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*. **2**: 618–620.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H & Heuertz M. 2003.** Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*. **163**: 1467–1482.
- Hasegawa M, Kishino H & Yano T. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**: 160–174.
- Hasenaka T. 1994.** Size, distribution and magma output rate for shield volcanoes of the Michoacán-Guanajuato volcanic field, central Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **63**(1-2): 13-31.
- Heffernan JM & Wahl LM. 2002.** The effects of genetic drift in experimental evolution. *Theoretical population biology*, **62**: 349-356.
- Heled J & Drummond AJ. 2008.** Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*. **8**: 289.
- Hey J & Nielsen R. 2004.** Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, **167**: 747–760.
- Hey J & Nielsen R. 2007.** Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *PNAS*, **104**: 2785–2790.

- Hey J. 2010.** Isolation with Migration Models for More Than Two Populations. *Molecular Biology and Evolution*, **27**(4): 905-920.
- Hieronimus H. 1995.** “Leven baren” wat is dat wigenlijk?. *Poecilia Nieuws*, **2**: 22-27.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG & Jarvis A. 2005.** Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**: 1965–1978.
- Hobolth A, Dutheil JY, Hawks J, Schierup MH & Mailund T. 2011.** Incomplete lineage sorting patterns among human, chimpanzee, and orangutan suggest recent orangutan speciation and widespread selection. *Genes & Development*, **21**(3): 349–356.
- Hubbs CL. 1924.** Studies of the fishes of the Order Cyprinodontes. I-IV. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich*, **13**: 1-31.
- Hubbs CL. 1926.** Studies of the fishes of the Order Cyprinodontes, VI. 3–87.
- Hubbs CL. 1932.** Studies of the fishes of the order Cyprinodontes, XII: A new genus related to *Empetrichthys*. 1–5.
- Hubbs CL. & Turner CL. 1939.** Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. XVI. A revision of the Goodeidae. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan*, **42**: 1-80.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M & Pritchard JK. 2009.** Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 1322–1332.
- Hudson RR, Kreitman M & Aguadé M. 1987.** A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics*, **116**: 153–159.
- Huelsenbeck JP, & Ronquist FR. 2001.** Mr. BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. **17**: 754-755.
- Irwin DE, Bensch S & Price TD. 2001.** Speciation in a ring. Abstract: Nature. *Nature*, **409**(6818): 333–337.
- Israde-Alcántara I & Garduño-Monroy VH. 1999.** Lacustrine record in a volcanic intra-arc setting: the evolution of Late Neogene Cuitzeo basin system (central-western Mexico, Michoacán). *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, **151**: 209-227.
- Israde-Alcántara I, Garduño-Monroy VH & Ortega MR. 2002.** Paleambiente lacustre del cuaternario tardío en el centro del lago de Cuitzeo. *Hidrobiología*, **12**(1): 61-78.
- Israde-Alcántara I, Garduño-Monroy VH, Fisher CT, Pollard HP & Rodríguez-Pasuca MA. 2005.** Lake level change, climate, and the impact of natural events: the role of seismic and volcanic events in the formation of the Lake Pátzcuaro Basin, Michoacán, Mexico. *Quaternary International*, **135**: 35-46.
- Israde-Alcántara I, Wade M, Garduño-Monroy VH, & Barron J. 2008.** Estratigrafía y encuadramiento geodinámico de las cuencas lacustres del centro de México. Unión Mexicana de Estudios del Cuaternario. *Fondo de Cultura Económica*. México, D. F.
- Israde-Alcántara I, Velázquez-Durán R, Lozano GSM, Bischoff J, Domínguez VG & Garduño-Monroy VH. 2010.** Evolución paleolimnológica del lago Cuitzeo, Michoacán durante el Pleistoceno-Holoceno, **62**: 345-357.

- Jakobsson M & Rosenberg NA. 2007.** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**: 1801–1806.
- Jarne P & Lagoda PJ. 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**: 424–429.
- Jordan DS. 1880.** Notes on a collection of fishes obtained in the streams of Guanajuato an in Chapala Lake. Mexico. By Prof. A. Duges. *Proc. U.S. Nat. Mus.* **2**(1879): 298-301.
- Jordan DF & Evermann BW. 1896-1900.** The Fishes of North and Middle America. *Bull. U.S. Nat. Mus.* **47**: 1-3313.
- Jordan DS & Gilbert CH. 1882.** List of fishes collected by John Xantus at Colima, Mexico. *Proc. U.S. Nat. Mus.* **5**: 353-371.
- Kalinowski ST & Waples RS. 2002.** Relationship of Effective to Census Size in Fluctuating Populations. *Conservation Biology*, **16**: 129–136.
- Kimura M & Crow JF. 1963.** The measurement of effective population number. *Evolution*, 279–288.
- Kimura M & Crow JF. 1964.** The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**: 725–738.
- Kimura M. 1969.** The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics*, **61**: 893–903.
- Kimura M. 1984.** *The Neutral Theory of molecular Evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kingston DIL. 1979.** Behavioral and morphological studies of the goodeid genus *Ilyodon*, and comparative behavior of fishes of the family Goodeidae. *Tesis de Doctorado*. University of Michigan, U.S.
- Kinziger APA, Nakamoto RJR, Anderson ECE & Harvey BCB. 2011.** Small founding number and low genetic diversity in an introduced species exhibiting limited invasion success (speckled dace, *Rhinichthys osculus*). *Ecology and Evolution*, **1**: 73–84.
- Kirkpatrick M & Jarne P. 2000.** The effects of a bottleneck on inbreeding depression and the genetic load. *The American Naturalist*, **155**(2): 154–167.
- Kocher TD. 2004.** Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics*. **5**: 288–298.
- Kruglyak S, Durrett R, Schug MD & Aquadro CF. 1998.** Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:10774-10778.
- Kubatko LS & Degnan JH. 2007.** Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Systematic Biology*, **56**: 17–24.
- Labonne J & Hendry AP. 2010.** Natural and sexual selection giveth and taketh away reproductive barriers: models of population divergence in guppies. *American Naturalist*, **176**: 26–39.

- Lacy RC. 1987.** Loss of genetic diversity from managed populations: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, **1**(2): 143–158.
- Lande R. 1982.** Rapid origin of sexual isolation and character divergence in a cline. *Evolution*. 213–223.
- Lanteri A & Confalonieri V. 2003.** Filogeografía: Objetivos, métodos y ejemplos. En Morrone J & Llorente J (eds): *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO, México, 185-194.
- Leffler EM, Bullaughey K, Matute DR, Meyer WK, Séguérel L, Venkat A, Aldolfatto P & Przeworski. 2012.** Revisiting an old riddle: What determines genetic diversity levels within species? *PLoS Biology*, **10**(9): e1001388.
- Librado P & Rozas J. 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- López-Ramos E. 1981.** Paleogeografía y tectónica del Mesozoico de México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, **5**(2): 158-177.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM & Sherwin WB. 1998.** Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The Journal of heredity*, **89**: 238–247.
- Lynch M. 2010.** Evolution of the mutation rate. *Trends in Genetics*, **26**(8): 345–352.
- Machordom A & Doadrio I. 2001.** Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**: 252-263.
- Macías GC & Ramírez E. 2005.** Evidence that sensory traps can evolve into honest signals. *Nature*, **434**: 501-505.
- Maddison WP. 1997.** Gene Trees in Species Trees. *Systematic Biology*. **46**(3): 523-536.
- Maddison WP & Knowles LL. 2006.** Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, **55**: 21–30.
- Mallet J. 2007.** Subspecies, semispecies, superspecies. *Encyclopedia of biodiversity*, **5**: 523–526.
- Mateo RG, Felicísimo ÁM & Muñoz J. 2011.** Modelos de distribución de especies: Una revisión sintética. *Revista Chilena de Historia Natural*, **84**: 217–240.
- Mayr E. 1942.** *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press.
- Mayurama T & Fuerst PA. 1985.** Population bottlenecks and non equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* **111**: 675-689.
- McDonald JH & Kreitman M. 1991.** Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*, **351**(6328): 652–654.
- Meek S E. 1902.** A contribution to the ichthyology of Mexico. *Field Columbian Mu. Publ.* 65 (Zool.) **3**(6): 63-128.

- Meek S E. 1904.** The fresh-water fishes of Mexico north of the Isthmus of Tehuantepec. *Field Columbian Mus. Publ.* 93 (Zool.) **5**: 1-252.
- Melbourne BA & Hastings A. 2008.** Extinction risk depends strongly on factors contributing to stochasticity. *Nature*, **454**(7200): 100–103.
- Meyer A & Lydeard C. 1993.** The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placentae and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes) inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene *X-src*. *Proc. Royal Soc. London Series B* **254**(1340): 153-162.
- Meyer A. 1994.** Shotcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. *Trends in Ecology & Evolution*, **9**(8): 278-280.
- Meyer MK, Radda AC & Domínguez-Domínguez O. 2001.** Notes on the genera *Neophorus* Hubbs & Turner, 1937, with a description of a new species of *Allotoca* from Laguna de Zacapu, Michoacán, Mexico (Teleostei, Cyprinodontiformes: Goodeidae). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, **103**(B): 453–460.
- Mezmouk S, Dubreuil P, Bosio M, Décousset L, CHarcosset A, Praud S & Mangin Brigitte. 2011.** Effect of population structure corrections on the results of association mapping tests in complex maize diversity panels. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **122**: 1149–1160.
- Miller RR & Fitzsimons JM. 1971.** *Ameca splendens*, a new genus and species of goodeid fish from western Mexico, with remarks on the classification of the Goodeidae. *Copeia*, **1**: 1-13.
- Miller RR, Minckley WL & Norris, SM. 2005.** Freshwater fishes of Mexico. University of Chicago Press, Chicago, USA, 652 pp.
- Moncayo R, Israde-Alcántara I & Garduño-Monroy VH. 2001.** La cherehuita *Hubbsina turneri* (Pices: Goodeidae), como caso de restricción geográfica de una especie endémica del Lerma. Características de su identidad taxonómica y distribución en el tiempo. *Hidrobiología*, **11**(1): 1-18.
- Montgomery ME, Woodworth LM, Nurthen RK, Gilligan DM, Briscoe DA & Frankham R. 2000.** Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conservation Genetics*, **1**: 33–43.
- Morelli S, Garduño-Monroy VH, Gigli G & Falorni G.** The Tancitaro debris avalanche: Characterization, propagation and modeling. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **193**: 93-105.
- Moritz C. 2002.** Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**: 238-254.
- Near TJ & Benard F. 2004.** Rapid allopatric speciation in logperch darters (Percidae: Percina). *Evolution*, **58**(12): 2798-2808.
- Nei M, Maruyama T & Chakraborty R. 1975.** The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1–10.
- Nei M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, 512 pp.

- Nielsen R & Palsbøll P. 1999.** Single-locus tests of microsatellite evolution: multi-step mutations and constraints on allele size. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11**(3): 477-484.
- Nielsen R & Wakeley J. 2001.** Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, **158**: 885–896.
- Nieto-Samaniego AF, Alaniz-Álvarez SA, Silva-Romo G, Eguiza-Castro MH & Mendoza-Rosales CC. 2006.** Latest Cretaceous to Miocene deformation events in the eastern Sierra Madre del Sur, Mexico, inferred from the geometry and age of major structures. *Geological Society of America Bulletin*, **118**(1-2): 238-252.
- Newton AJ, Metcalfe SE, Davies SJ, Cook G, Barkers P & Telford RJ. 2005.** Late Quaternary volcanic record from lakes of Michoacán, central Mexico. *Quaternary Science Reviews*, **24**(1-2): 91–104.
- O'Hara SL. 1993.** Historical evidence of fluctuations in the level of Lake Pátzcuaro, Michoacán, Mexico over the last 600 years. *Geographical Journal*, **159**: 51–62.
- O'Hara SL, Metcalfe SE & Street-Perrott FA. 1994.** On the arid margin: The relationship between climate, humans and the environment. A review of evidence from the highlands of central Mexico. *Chemosphere*, **29**(5): 965–981.
- O'Hara SL & Metcalfe SE. 1995.** Reconstructing the climate of Mexico from historical records. *The Holocene*, **5**(4): 485–490.
- Ownby S, Delgado-Granados H, Rebecca AL & Hall CM. 2007.** Volcán Tancítaro, Michoacán, Mexico, $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ constraints on its history of sector collapse. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **161**(1-2): 1-14.
- Oosterhout VC, Hutchinson FW, Wills PMD & Shipley P. 2004.** Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 535-538.
- Ortega B, Caballero C, Lozano S, Israde-Alcántara I, & Vilaclara G. 2002.** 52000 years of environmental history in Zacapu Basin, Michoacán, México. *The Magnetic records: Earth and Planetary Science Letters*, **202**: 663-675.
- Ortega B, Vázquez G, Caballero M, Israde-Alcántara I, Lozano S, Schaaf P & Torres E. 2010.** Late Pleistocene – Holocene record of environmental changes in lake Zirahuén, central Mexico. *Journal of Paleolimnology*, **44**(3): 745-760.
- Ota T & Kimura M. 1973.** A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research*, **22**: 201–204.
- Otto-Bliesner BL, Marshall SJ, Overpeck JT, Miller GH & Hu A. 2006.** Simulating Arctic climate warmth and icefield retreat in the last interglaciation. *Science*, **311**: 1751–1753.
- Otto-Bliesner BL, Brady EC, Clauzet G, Tomas R, Levis S & Kothavala Z. 2006a.** Last Glacial Maximum and Holocene Climate in CCSM3. *Journal of Climate*, **19**: 2526–2544.
- Panhuis TM, Butlin R, Zuk M & Tregenza T. 2001.** Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**(7): 364-371.

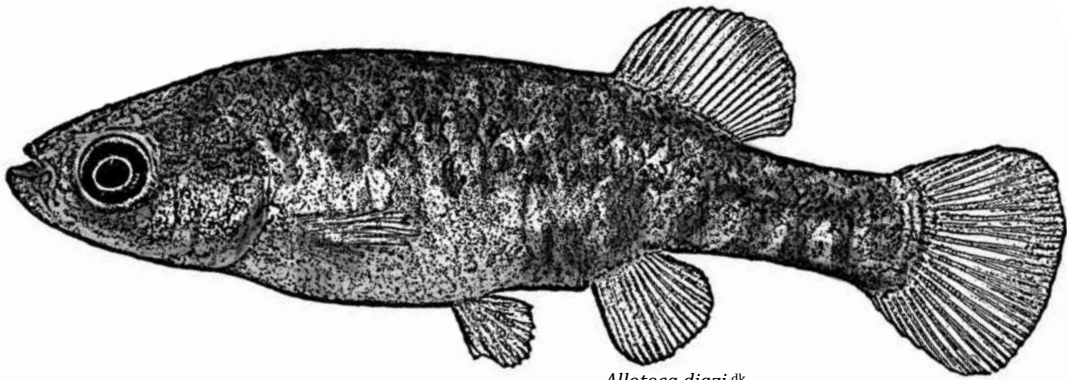
- Parenti L. 1981.** A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **168**: 335-557.
- Peacock MM, Beard KH, O'Neill EM, Kirchoff VS & Peters MB. 2009.** Strong founder effects and low genetic diversity in introduced populations of Coqui frogs. *Molecular Ecology*, **18**(17): 3603–3615.
- Peery MZM, Kirby RR, Reid BNB, Stoelting RR, Doucet-Béer EE, Robinson SS, Vásquez-Carrillo CC, Pauli JN & Palsbøll PJ. 2012.** Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, **21**: 3403–3418.
- Perdices AA, Carmona JAJ, Fernández-Delgado CC & Doadrio II. 2001.** Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killifish *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Heredity*, **87**: 314–324.
- Pérez-Rodríguez R, Pérez-Ponce de León G, Domínguez-Domínguez O & Doadrio I. 2009.** A new species of *Algansea* (Actinopterygii : Cyprinidae) from the Ameca River basin, in Central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **80**: 483-489.
- Perfectti F. 2002.** Especiación: Modos y Mecanismos. En Soler M (edr): *Evolución: La base de la biología*, 1–15.
- Phillips SJ, & Wentworth CP. 2000.** *A natural history of the Sonoran Desert*. University of California Press (eds). ISBN 0-520-21980-5.
- Phillips SJ, Anderson RP & Schapire RE. 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modelling*, **190**: 231–259.
- Phillips SJ & Dudík M. 2008.** Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**: 161–175.
- Pollard HP. 2009.** Mesoamerican Ritual Economy: Archaeological and Ethnological Perspectives: En EC Wells, KL Davis-Salazar, (eds): *Las Sociedades Complejas del Occidente de México en el Mundo Mesoamericano*. *Historian*, **71**(4):, 868–869.
- Pollard HP. 2012.** La economía política del almacenaje en el estado tarasco prehispánico. En Michelet D, Bortot & Darras V (eds): *Almacenamiento prehispánico del norte de México hasta el Antiplano central*. México, 131-144.
- Posada D. 2003.** Using Modeltest and Paup* to select a model of nucleotide substitution. En Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Petsko GA, Stein LD & Stormo GD (eds): *Current protocols in bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc. 6,5,1-6,5,14 pp.
- Posada D. 2008** jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**: 1253-1256.
- Price T. 1998.** Sexual selection and natural selection in bird speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**: 251–260.
- Pritchard KJ, Stephens M & Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.

- Qu Y, Zhang R, Quan Q, Song G, Li SH & Lei F. 2012.** Incomplete lineage sorting or secondary admixture: Disentangling historical divergence from recent gene flow in the Vinous-throated parrotbill (*Paradoxornis webbianus*). *Molecular Ecology*, **21**(24): 6117–6133.
- Ramirez J & Jarvis A. 2008.** High resolution statistically Downscaled future climate surfaces. International Center for Tropical Agriculture (CIAT); CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). Cali, Colombia.
- Ramirez J & Jarvis A. 2008a.** Dissaggregation of global circulation model outputs. International Center for Tropical Agriculture (CIAT); CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). Cali, Colombia.
- Rannala B & Yang Z. 2003.** Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*, **164**: 1645–1656.
- Ray N, Currat M & Excoffier L. 2003.** Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, **20**: 76–86.
- Regan CT. 1906-08.** Pisces. En: *Biología Centrali-America*, **8**: 1-203.
- Ricciardi A & Simberloff D. 2009.** Assisted colonization is not a viable conservation strategy. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**(5): 248–253.
- Rice WR. 1989.** Analysing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, **43**(1): 223-225.
- Ritchie MG, Webb SA, Graves JA, Magurran E & Macías GC. 2005.** Patterns of speciation in endemic Mexican Goodeid fish: sexual conflict or early radiation?. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 922-929.
- Ritchie MG, Hamil RM, Graves JA, Magurran E, Webb SA & Macías GC. 2007.** Sexual differentiation: population genetic divergence and sexual dimorphism in Mexican goodeid fish. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**: 2048-2055.
- Robles-Camacho J, Corona-Chávez P, Morales-Gómez M, Guzmán AF, Polaco JO, Domínguez-Vázquez G, Israde-Alcántara I & Olivares-Morales A. 2010.** Estratigrafía y paleoambiente asociados a un Gomphoteriidae (*Cuvieronius hyodon*) en Tzintzuntzan, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, **27**(3): 530-544.
- Rosas J, Ferrari L, López M & Urrutia FJ. 1997.** Stratigraphy and tectonic of the Guadalajara region and triple-junction area. Western Mexico. *International Geology Review*, **39**: 125-140.
- Rosenberg NA & Feldman MW. 2002.** The relationship between coalescence times and population divergence times. In Slatkin MW, Veuille M (eds): *Modern developments in theoretical population genetics*. Oxford University Press. UK.
- Rosenberg NA. 2003.** DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 137–138.
- Rosenfeld JA, Payne A & DeSalle R. 2012.** Random roots and lineage sorting. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**: 12–20.
- Roskamp H. 1998.** *La historiografía indígena de Michoacán*. Research School CNWS. 370 pp.
- Rousset F. 2008.** Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Biology and Ecology Resources*, **8**: 103-106.

- Salzburger W. 2009.** The interaction of sexually and naturally selected traits in the adaptive radiations of cichlid fishes. *Molecular Ecology*, **18**: 169–185.
- Sanderson MJ. 2002.** Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, **19**: 101-109.
- Schlötterer C. 2000.** Evolutionary dynamics of microsatellite Dna. *Chromosoma*, **109**: 365-371.
- Seddon PJ. 2010.** From reintroduction to assisted colonization: Moving along the conservation translocation spectrum. *Restoration Ecology*, **18**(6): 796–802.
- Seehausen O & van Alphen JJM. 1999.** Can sympatric speciation by disruptive sexual selection explain rapid evolution of cichlid diversity in Lake Victoria? *Ecology Letters*, **2**: 262–271.
- Shimoda N, Knapik EW, Ziniti J, Sim C, Yamada E, Kaplan S, Jackson D, Sauvage F, Jacob H & Fishman MC. 1999.** Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genome*, **58**: 219–232.
- Silvestro D & Michalak I. 2012.** raxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organism Diversity & Evolution*, **12**: 335-337.
- Smith ML. 1980.** The evolutionary and ecological history of the fish fauna of the Rio Lerma Basin, Mexico. Ph.D. Thesis. Univ. Michigan.
- Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP & Van Der Linde A. 2002.** Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, **64**: 583–639.
- Stamatakis A. 2006.** RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**(21): 2688-2690.
- Street-Perrott FA, Perrott RA & Harkness DD. 1989.** Anthropogenic soil erosion around Lake Patzcuaro, Michoacan, Mexico, during the Preclassic and late Postclassic-Hispanic periods. *American Antiquity*, **54**(4): 759–765.
- Stuessy TF, Takayama K & Sepúlveda PL. 2012.** Founder effects are invisible in endemic species of oceanic islands. *Journal of Biogeography*, **39**(9): 1565–1566.
- Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 585–595.
- Tajima F. 1996.** The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, **143**(3): 1457–1465.
- Tamayo J. 1949.** *Geografía general de México*. Tomos I y II. Instituto de Investigaciones Económicas, Trillas, México. Tucson Arizona University, Department of Systems and Industrial Engineering.
- Tamayo LT, & West RC. 1964.** The hidrology of middle America. En Wanchope, R. & West, R. C. (eds): *Handbook of Middle America Indians*. University of Texas Press, U.S.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S. 2011.** MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distancias and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731-2739.

- Tavaré S. 1986.** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life. Sci*, **17**: 57-86.
- Templeton AR. 1980.** The theory of speciation via the founder principle. *Genetics*, **94**(4): 1011–1038.
- Templeton AR. 1989.** The meaning of species and speciation: A genetic perspective. *The Units of Evolution*, 159–183.
- Templeton AR. 2008.** The reality and importance of founder speciation in evolution. *BioEssays*, **30**(5): 470–479.
- Toledo A. 2003.** *Ríos, costas, mares: Hacia un análisis integrado de las regiones hidrológicas de México*. El Colegio de Michoacán, 117 pp.
- Toledo A & Bozada L. 2002.** *El delta del río Balsas: Medio ambiente, pesquerías y sociedad*. El Colegio de Michoacán, 293 pp.
- Thomas CD. 2011.** Translocation of species, climate change, and the end of trying to recreate past ecological communities. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**(5): 216–221.
- Uribe MC, De la Rosa G, Guerrero SM, García-Alarcón A & Aguilar ME. 2004.** Estructura del ovario de teleósteos vivíparos. Gestación intraovárica: intraluminal en *Ilyodon whitei* (Goodeidae), e intrafolicular en *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae). En Lozano-Vilano, M. L. Contreras-Balderas, A. J. (eds): *Homenaje al Doctor Andrés Reséndez Medina*. UANL. México.
- Vázquez G, Ortega B, Davies JS & Aston JB. 2010.** Registro sedimentario de los últimos ca. 17000 años del lago de Zirahuén, Michoacán, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, **63**(3): 325-343.
- Via S. 2001.** Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**: 381–390.
- Voelker G. & Edwards S V. 1998.** Can weighting improve bushy trees? Models of cytochrome *b* evolution and the molecular systematic of pipits and wagtail (Aves: Motacillidae). *Systematic Biology*, **47**(4): 589-603.
- Voight BF. 2005.** Interrogating multiple aspects of variation in a full resequencing data set to infer human population size changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(51): 18508–18513.
- Wagner CEC, Harmon L JL & Seehausen OO. 2012.** Ecological opportunity and sexual selection together predict adaptive radiation. *Nature*, **487**: 366–369.
- Wahl LML, Gerrish PJP & Saika-Voivod II. 2002.** Evaluating the impact of population bottlenecks in experimental evolution. *Genetics*, **162**(2): 961–971.
- Wang J & Whitlock MC. 2003.** Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics*, **163**: 429–446.
- Watterson GA. 1975.** On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical population biology*, **7**: 256–276.

- Watts WA & Bradbury JP. 1982.** Paleocological studies at Lake Patzcuaro on the west-central Mexican Plateau and at Chalco in the Basin of Mexico. *Quaternary Research*, **17**: 56–70.
- Webb SA. 1998.** A phylogenetic analysis of the Goodeidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). Ph.D. Dissertation, University Michigan, Ann Arbor, MI.
- Webb SA, Graves JA, Macias-Garcia C, Magurran AE, Foighil D & Ritchie MG. 2004.** Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**: 527-544.
- Weber JL & Wong C. 1993.** Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics*, **2**: 1123–1128.
- Weir BS & Cockerham CC. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**(6): 1358-1370.
- Whitlock MC, Bürger R & Dieckmann U. 2004.** Fixation of new mutations in small populations. *Evolutionary conservation biology*. International Institute for Applied Systems Analysis, Austria.
- Whittaker RJ & Fernández-Palacios JM. 2007.** Island Biogeography: Ecology, Evolution, and Conservation. *Oxford University Press*.
- Wiley EO. 1978.** The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Biology*, **27**: 17–26.
- Williams E & Weigand PC. 1996.** *Las Cuencas Del Occidente de México*. Colegio de Michoacan.
- Wourms JP. 2005.** Functional morphology, development, and evolution of trophotaenia. En Uribe-Aranzabal, M. C. & Grieg, H. (eds): *Viviparous fishes*. New Life Publications, Homestead, Florida, USA.
- Wright S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. **15**: 323–354.
- Wright S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, **19**: 395–420.
- Wu Y. 2011.** Coalescent-based species tree inference from gene tree topologies under incomplete lineage sorting by maximum likelihood. *Evolution*, **66-3**: 763–775.
- Yue GH, David L & Orban L. 2007.** Mutation rate and pattern of microsatellites in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetica*, **129**: 329–331.
- Yu Y, Than C, Degnan JH & Nakhleh L. 2011.** Coalescent histories on phylogenetic networks and detection of hybridization despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, **60**: 138–149.
- Zhan A, Darling JA, Bock DG, Lacouisière-Roussel A, Macisaac HJ & Cristescu E. 2012.** Complex genetic patterns in closely related colonizing invasive species. *Ecology and Evolution*, **2**(7): 1331–1346.
- Zardoya R & Doadrio I. 1999.** Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European Cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, **49**: 227-237.



Allotoca diazi ^{dk}