



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS GENÉTICO DE *Astyanax mexicanus*
(CHARACIDAE, TELEOSTEI, PISCES) DE LA
VERTIENTE ATLÁNTICA DE MÉXICO USANDO
MICROSATÉLITES**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología de Zonas Áridas)

Presenta

SARAI ESQUIVEL BOBADILLA

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2011

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 24 del Mes de Junio del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ANÁLISIS GENÉTICO DE *Astyanax mexicanus* (CHARACIDAE, TELEOSTEI, PISCES) EN LA VERTIENTE ATLÁNTICA DE MÉXICO USANDO MICROSATÉLITES"

Presentada por el alumno:

Sarai Esquivel Bobadilla

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Ecología de Zonas Áridas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

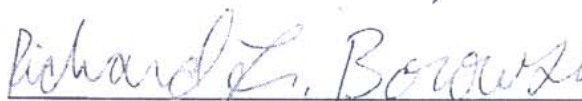
LA COMISION REVISORA



Dr. Francisco J. García de León
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Alejandro A. Maeda Martínez
CO-TUTOR



Dr. Richard L. Borowsky
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACION DEL COMITE

COMITE TUTORIAL

Dr. Francisco Javier García de León
Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de México, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de México, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. Richard L. Borowsky
Co-Tutor
New York University, New York, U.S.A.

COMITE REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier García de León
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez
Dr. Richard L. Borowsky

JURADO EN EXAMEN DE GRADO

Dr. Francisco Javier García de León
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez
Dr. Eduardo Francisco Balart Páez

Suplente

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

RESUMEN

La sardinita plateada *Astyanax mexicanus* (Characidae, Teleostei), es un pez dulceacuícola de tamaño pequeño (12 cm de longitud total) que generalmente vive en grupos numerosos en corrientes rápidas, aguas tranquilas de ríos y arroyos, así como en lagos y represas. Considerada una especie exitosa por su alta capacidad de dispersión y adaptación a diferentes hábitats, incluyendo aguas subterráneas, presenta alta variabilidad morfológica a lo largo de su distribución en México lo que ha traído confusión en el estatus taxonómico de esta especie, siendo su morfotipo más extremo el hipogeo o troglobio, el cual no presenta ojos ni coloración. Debido a que la mayoría de los estudios de estructura poblacional en *Astyanax mexicanus* se han enfocado principalmente a las poblaciones de cuevas y sus conspecíficos de superficie cercanas a estas, y los más extensivos revelan muestreos incompletos a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana, las interpretaciones a las que se han llegado podrían ser erróneas. Así pues, este estudio mediante la identificación de los individuos con ayuda de claves taxonómicas, el uso de una batería de 10 loci microsátélites, el aumento de la cobertura de muestreo a lo largo de las principales cuencas hidrológicas en la vertiente Atlántica, podrá proveer una perspectiva más clara sobre la diversidad genética, estructura y relaciones genéticas entre las distintas poblaciones de *Astyanax*, incluyendo muestras de *Bromocharax caballeroi* del Lago Catemaco, ya que de acuerdo a trabajos previos, parece ser una variación morfológica mas dentro del género de *Astyanax*.

Taxonómicamente se identificaron a los individuos del norte como *Astyanax mexicanus*, mientras que los sureños corresponden a *Astyanax aeneus*, sin embargo las distancias genéticas presentes entre ellos no sustentan tal separación. Igualmente los individuos de Catemaco mostraron características morfológicas típicas de *Astyanax* además de mostrar distancias genéticas semejantes a las de *Astyanax*, por lo que parece ser una variante más dentro de *Astyanax*. Por otra parte, con el uso de los microsátélites se develó mediante distintos análisis (AFC, F_{ST} , AMOVA y STRUCTURE) 10 poblaciones genéticamente homogéneas, siendo las poblaciones de cuevas las que mostraron mayores niveles de diferenciación y distancias genéticas que las poblaciones de superficie. Las poblaciones cercanas a las cuevas mostraron menor grado de divergencia con las poblaciones sureñas que con las poblaciones de cuevas y el no encontrar un aislamiento por distancia sería indicativo de 2 olas de invasión dirección sur-norte propuesto anteriormente. El dendrograma construido a partir de distancias genéticas (D_{CE}) mostró un patrón muy similar a lo encontrado con los análisis de AFC, F_{ST} , AMOVA, y STRUCTURE, pero al añadir por primera vez poblaciones norteñas a las cuevas, se observó que las poblaciones de cuevas forman un grupo intermedio entre las poblaciones norteñas y sureñas, y el hecho encontrar un aislamiento por distancia entre las poblaciones norteñas y su correlación de estas con cada unas de las poblaciones sureñas, supondría al menos una tercera ola invasiva dirección sur-norte en tiempos más recientes, por lo que el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano no parece ser una barrera geográfica como lo ha sido para otras especies. Finalmente, la población de Catemaco mostró bajos niveles de diferenciación con la población norteña de Garza Valdez/Troncones, lo cual posiblemente se deba a una señal genética ancestral o posiblemente a la actividad antropogénica.

Palabras clave: *Astyanax*, estructura poblacional, microsátélites.

ABSTRACT

The *Astyanax mexicanus* (Characidae, Teleostei), is a fresh water fish of small size (12 cm total length) that usually live in large groups in fast currents, calm waters of rivers and streams, and lakes and dams. Considered a successful species for its high dispersal ability and adaptation of different habitats, including groundwater, presents high morphological variability throughout its distribution in Mexico, which has brought confusion in the taxonomic status of this species, and its most extreme morphotype the hypogeous or Troglobite, which has no eyes and color. The most studies of population structure in *Astyanax mexicanus* have focused primarily on populations of cave and near of these, and the incomplete sampling along the Atlantic slope of Mexico, can lead to wrong interpretations. Thus this study by identifying with individuals with the help of taxonomic keys, using a battery of 10 microsatellite loci, increased sampling coverage along of hydrological basins on the Atlantic slope, may provide a clear perspective on genetic diversity, structure and genetic relationships between different populations of *Astyanax*, including samples of *Bromocharax caballeroi* from Catemaco Lake, since according to previous work, it seems a morphological variation within the genus *Astyanax*.

Taxonomically individuals were identified as *Astyanax mexicanus* in the north, while southerners was *Astyanax aeneus*, however the present genetic distances between them do not support such separation. The individuals from Catemaco lake also showed morphological characteristics typical of *Astyanax* in addition to showing genetic distances similar to those of *Astyanax*, for what appears to be a variant in *Astyanax*. Moreover, the use of microsatellites revealed by various analyses (AFC, F_{ST} , AMOVA and STRUCTRE) 10 genetically homogeneous populations, where the caves populations showed higher levels of differentiation and genetic distances than the surface populations. The populations near to the caves showed lower degree of divergence from the southern populations than with the caves populations, and the failure to find isolation by distance would indicate two waves of invasion from south to north proposed previously. The dendrogram constructed from genetic distances (D_{CE}) showed a pattern very similar to that found with the analysis of AFC, F_{ST} , AMOVA and STRUSTURE, but adding first time northern populations to the caves, it was observed that the caves populations are an intermediated group between northern and southern populations, and the fact find the isolation by distance among northern populations and the correlation of these with each one the southern populations, would be at least a third wave invasive south-north direction in recently time, so the Tans-Mexican Volcanic Belt no appears to be a geographical barrier like it has for other species. Finally the populations of Catemaco showed low levels of differentiation with the northern population of Garza Valdez/Troncones, probably due to a ancestral genetic signal or to anthropogenic activity.

Key words: *Astynax*, populations structure, microstellites.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis papas, Román Esquivel y Marisela Bobadilla, mis hermanos Arturo y Abraham, quienes siempre han confiado en mí y me han dado todo su amor y apoyo incondicional, a mi cuñada Esmeralda y la nueva integrante de la familia, mi sobrina Olivia, las quiero mucho.

A ti mi Angelito, que has llenado mi vida de amor y cariño y me has apoyado en este trayecto de mi vida, y en especial a esa personita pequeñita que todavía no pisa esta Tierra, pero que ya es el amor de mi vida.

A mis amigas incondicionales: Barbie, Lu y Coco

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco al CIBNOR, como institución receptora donde pude realizar mis estudios de posgrado y al CONACYT por la beca otorgada para mi manutención.

Al Dr. Francisco García de León (Paco) por el apoyo y enseñanzas que me sirvieron y formaron durante la realización de este trabajo. Sobre todo por la salida de campo a la Huasteca, toda una experiencia andar metida en las cuevas, pero finalmente, después de casi 11 años que se inicio este proyecto, salió Paco!!!!!!

A mi comité tutorial, el Dr. Alejandro Maeda, Dr. Richard Borowsky y Dr. Eduardo Balart, cuyas correcciones, comentarios, y sugerencias enriquecieron este trabajo.

A todos los amigos y compañeros del grupo de Genética para la Conservación: Miguel, Fausto, Rubén, Carolina, Tania, Cristina, Davis, Emiliano, Adrian, Claudia. A los que han estado en el laboratorio en estancias: Alain, Monserrat, Ilse, Paco, Tzitziki, Andrés. Muchas gracias a todos por los consejos, sugerencias y sobre todo por hacer mas amenas las horas del laboratorio y también fuera de este, muy buenas y divertidas las carnes asadas en casa de Paco!!!!

A Lucia Campo (Lucy), por la ayuda para la identificación de los peces.

A mis amigos: Bárbara, Mauricio, Emmanuel, Vandick, Marina, José Alberto (Oso), Ruth, por todo el apoyo y cariño incondicional que he recibido desde que vivo en la Paz. Muy ricas y divertidas las cenas y las comidas!!!

A mis compañeros de generación: Paty, Rosy, Estrellita, Dany, Viri, Vero, Lalito, Meli, Lulu, Merit y Goretti.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Estudios morfológicos.....	4
2.2 Estudios genéticos.....	5
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos particulares.....	12
5. HIPÓTESIS	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1 Área de estudio.....	14
6.2 Trabajo de campo.....	14
6.3 Trabajo de laboratorio.....	16
6.3.1 Identificación de individuos.....	16
6.3.2 Extracción de ADN.....	17
6.3.3 Estandarización de microsatélites vía PCR.....	17
6.3.4 Genotificación de individuos.....	18
6.4 Análisis de datos.....	19
6.4.1 Identificación de individuos mediante distancias genéticas.....	19
6.4.2 Determinación del número de poblaciones.....	20
6.4.2.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).....	20
6.4.2.2 Índices de fijación de Wright.....	20
6.4.2.3 Flujo genético.....	21
6.4.2.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	21
6.4.2.5 Determinación del número de poblaciones mediante probabilidades bayesianos.....	22
6.4.3 Reconstrucción de dendrogramas.....	23

6.4.3.1 Estimación de las distancias genéticas.....	23
6.4.3.2 Construcción del dendrograma.....	23
6.4.4 Aislamiento por distancia.....	24
6.4.5 Variación de microsatélites y medidas de diversidad genética.....	24
6.4.5.1 Estimación de alelos nulos, Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.....	24
6.4.5.2. Medidas de diversidad genética.....	25
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Identificación de individuos.....	27
7.1.1 Identificación morfológica de los individuos.....	27
7.1.2 Identificación de individuos mediante distancias genéticas.....	29
7.2 Determinación del número de poblaciones.....	30
7.2.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).....	30
7.2.2 Índices de fijación de Wright.....	33
7.2.3 Flujo Genético.....	35
7.2.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	35
7.2.5 Empleo de probabilidades bayesianas.....	36
7.3 Reconstrucción del dendrograma.....	38
7.4 Aislamiento por distancia.....	40
7.5 Variación de microsatélites y medidas de diversidad genética.....	43
7.5.1 Estimación de alelos nulos, Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.....	43
7.1.2 Medidas de diversidad genética.....	45
8. DISCUSIÓN.....	47
8.1 Identificación taxonómica de individuos.....	48
8.2 Número de poblaciones de <i>A. mexicanus</i> con AFC, valores de F_{ST} , AMOVA y Structure.....	52

8.3 Similitudes genéticas mediante la reconstrucción de dendrogramas en <i>Astyanax mexicanus</i>	55
8.4 Aislamiento por distancia.....	60
8.5 Variación de microsatélites y medidas de diversidad genética.....	62
9. CONCLUSIONES	63
10. LITERATURA CONSULTADA	65
11. ANEXOS	72
ANEXO I	72
ANEXO II	74
ANEXO III	76
ANEXO IV	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A) Forma de superficie o epigea de <i>Astyanax mexicanus</i> , en la cual se observan ojos bien desarrollados y pigmentación. B) Forma de cueva o hipogea de <i>Astyanax mexicanus</i> , la cual no presenta ojos y tampoco coloración. C) <i>Bromocharax caballeroi</i> , de la localidad Lago Catemaco.....	3
Figura 2.	Mapa de la región de la Sierra del Abra. En esta figura se muestra la ubicación de las diferentes cuevas, destacándose con puntos en rojo aquellas que han sido más estudiadas	7
Figura 3.	Parte superior del árbol realizado por Ornelas-García <i>et al.</i> (2008) con los marcadores de Cyt b, COI, 16S y RAG1, en el cual se observa como los individuos pertenecientes al género <i>Bromocharax</i> aparecen dentro de las diferentes ramas de <i>Astyanax</i> , no formando así un grupo monofilético.....	10
Figura 4.	Mapa de las localidades donde se hicieron las colectas de <i>Astyanax mexicanus</i> a lo largo de las distintas cuencas en la vertiente Atlántica Mexicana durante el periodo 2000-2009.....	15
Figura 5.	AFC utilizando las frecuencias alélicas en las 16 localidades muestreadas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. Los individuos dentro del círculo azul corresponden a la cueva Pachón (PCH), dentro del verde ubicamos a la cueva Molino (ML), dentro del rojo están las cuevas de Sabinos (SAB) y Tinajas (TIN) y el círculo morado corresponde al resto de las poblaciones, las cuales son todas de superficie.....	30
Figura 6.	Factorial de Correspondencia para 12 localidades de superficie muestreadas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana, visualización frontal. Los individuos dentro del círculo azul corresponden a las poblaciones de San Fernando (SF), Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), dentro del círculo verde ubicamos a Cuatrociénegas (CC), el círculo rojo corresponde a la población de El Zapotal (V) y dentro del círculo rosa están las poblaciones de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA), Huichihuayan (SLP), Catemaco (CAT), Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ).....	31

- Figura 7.** Análisis Factorial de Correspondencia para 12 localidades de superficie muestreadas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana, visualización superior. Los individuos dentro del círculo azul corresponden a la población de San Fernando, dentro del círculo gris están Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), dentro del círculo verde ubicamos a Catemaco, dentro del círculo rosa se ubican las poblaciones de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA), Huichihuayan (SLP), dentro del círculo morado se encuentran Teapa (TE), (Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ) y el círculo rojo corresponde a la población de El Zapotal (V)..... **32**
- Figura 8.** A) Representa el número de poblaciones inferidas (K) de *Astyanax mexicanus* a partir del cálculo de $\text{LnP}(D)$ promedio de 10 repeticiones con el uso de programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). B) Número de grupos genéticamente homogéneos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud o ΔK (Evanno *et al.*, 2005)..... **36**
- Figura 9.** Número de poblaciones determinado por el programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard, 2000). Cada una de las líneas verticales representa el genotipo multilocus determinado por las frecuencias alélicas para cada individuo. El color café claro caracteriza a Cuatrociénegas (CC), el verde a San Fernando (SF), el azul claro representa a Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), el rojo es característico de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP), el color celeste es distintivo de cueva Molino (ML), el naranja describe a la cueva de Pachón (PCH), el púrpura representa a las cuevas de Sabinos (SAB) y Tinajas (TIN), El Zapotal (V) está representado por el color azul, el color rosa es representativo de Catemaco (CAT) y el amarillo es distintivo de las poblaciones de Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales..... **38**
- Figura 10.** Dendrograma reconstruido mediante el método del vecino más cercano (NJ) no enraizado, basado en distancias D_{CE} (Cavalli-Sforza y Edwads, 1967) por pares de poblaciones usando 10 loci microsatélites. El soporte de las ramas se realizó mediante Bootstrapping con 10,000 permutaciones..... **39**
- Figura 11.** Gráfica que muestra la distancia geográfica (en kilómetros) contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linealizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$). La función en el gráfico, indica una ecuación de regresión lineal obtenida de los datos..... **40**

- Figura 12.** Grafica que muestra el Ln de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para las 12 localidades de superficie. La función en el gráfico, indica una ecuación de regresión lineal obtenida de los datos..... **41**
- Figura 13.** Grafica que muestra el Ln de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para las localidades norteñas. La función en el gráfico, indica una ecuación de regresión lineal obtenida de los datos..... **42**
- Figura 14.** Grafica que muestra el Ln de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para cada una de las localidades norteñas contra las localidades Sureñas. La función en el gráfico, indica una ecuación de regresión lineal obtenida de los datos..... **42**
- Figura 15.** Valores promedio del numero de alelos (N_a), alelos efectivos (N_e), riqueza alélica (R), heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada no sesgada (H_e) e índice de fijación (F) para las poblaciones muestreadas de *Astyanax mexicanus*..... **47**
- Figura 16.** Tomada de Ornelas-García *et al.* (2008). Esta imagen muestra el subárbol (parte superior) con los métodos de Inferencia Bayesiana y Máxima Parsimonia para *Astyanax* y *Bromocharax* utilizando Citocromo b.... **51**
- Figura 17.** Ilustración tomada de Strecker *et al.* (2003), muestra un árbol Neighbour-Joining que describe las relaciones entre las poblaciones de cuevas y las de superficie basado en las medidas de distancia de Nei y usando un juego de con 6 loci microsatélite. Los números sobre las líneas son los valores de bootstrap basado en el locus (número superior) o de manera individual (número inferior)..... **56**

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Coordenadas de las localidades muestreadas, número de individuos colectados, cuenca a la que pertenecen las localidades, fecha de colecta y acrónimo.....	14
Tabla II	Iniciadores, condiciones y programas de amplificación que fueron empleados para cada uno de los loci microsátélites. Strecker (2003) y Protas <i>et al.</i> (2006).....	18
Tabla III	Características merísticas descriptivas de <i>Astyanax mexicanus</i> y <i>Astyanax aeneus</i> de acuerdo a los autores Contreras-Balderas y Lozano-Vilano (1988) y Paulo-Maya (1994). También se incluyen las características descritas para <i>Bromocharax Caballeroi</i> para el Lago Catemaco (Contreras-Balderas y Rivera-Teillery, 1976).....	28
Tabla IV	Identificación taxonómica de los individuos de acuerdo a Lozano-Vilano y Contreras-Balderas (1990) para las localidades analizadas, la cuenca hidrológica a la que pertenece y su respectivo acrónimo.....	29
Tabla V	Distancias de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) entre las distintas localidades de superficie identificadas morfológicamente.....	29
Tabla VI	La parte diagonal superior muestra el número de migrantes eficaces (Nm), los valores en negrita son los que presentan más de un migrante. La parte diagonal inferior representa las comparaciones pareadas de los valores obtenidos de F_{ST} en la localidades muestreadas de <i>Astyanax mexicanus</i> a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. Todos los valores mostraron ser significativos, a excepción de los que se presentan en color verde, ya que estos no fueron significativos. Los números en rojo son considerados valores muy elevados de F_{ST} , los que están en negro son considerados como moderados, mientras que los que se encuentran en azul son pequeños, pero significativos.....	34
Tabla VII	Análisis de varianza molecular (AMOVA) de estructura genética poblacional multilocus de <i>Astyanax mexicanus</i> a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. Los valores en negrita indican que el valor estadístico de F es significativamente diferente de cero, $P < 0.05$	35

Tabla VIII	Frecuencia de alelos nulos por locus y población. Estimación según el estimador de Brookfield 1 y el algoritmo EM con los programas de MicroChecker (Van Oosterhout <i>et al.</i> , 2004) y FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007). Se muestra el valor de <i>P</i> para el estimador de Brookfield 1, siendo significativos los marcados con *.....	43
Tabla IX	Comparación del desequilibrio de ligamiento por pares de locus en <i>Astyanax mexicanus</i> arrojados por el programa GENPOP (Raymond y Rousset, 2001).....	44
Tabla X	Variabilidad genética estimada mediante 10 loci microsatélite de <i>Astyanax mexicanus</i> en las localidades muestreadas. Se muestra el tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), alelos efectivos (Ne), riqueza alélica (R), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He) y el índice de fijación (F). * En desequilibrio de Hardy-Weinberg después del ajuste Bonferroni con $P < 0.001$	45

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Visualización de extracción de ADN total en gel de agarosa al 1%..... **73**
- Figura 2.** Gel de acrilamida teñido con plata para la visualización de los alelos, que en este caso corresponden a la localidad de Río Tezendaes para el locus V-f9..... **75**
- Figura 3.** **A)** Dientes maxilares y mandibulares presentes en los individuos colectados en la localidad de Catemaco. Se observa que los dientes maxilares presentan de 5 a 7 cúspides, mientras que los mandibulares presentan 5 cúspides. **B)** Dientes maxilares y mandibulares presentes en individuos identificados como *Astyanax*. Se observa que los dientes maxilares y mandibulares presentan 5 cúspides..... **83**

LISTA DE TABLAS

- Tabla I.** Características merísticas usadas para la identificación de individuos en las distintas localidades de muestreo **76**

1. INTRODUCCIÓN

La sardina plateada *Astyanax mexicanus* (Characidae, Teleostei) constituye una de las especies más ampliamente estudiadas y pertenece a una de las familias más diversas en el mundo (Wiley y Mitchell, 1971). Es un pez dulceacuícola de tamaño pequeño que llega a tener un máximo de 12 cm de longitud total, generalmente vive en grupos numerosos en corrientes rápidas, en aguas tranquilas de ríos y arroyos, así como en lagos y represas (Álvarez del Villar, 1970). En México la sardina plateada se encuentra ampliamente distribuida, abarcando la totalidad de la vertiente del Golfo de México, mientras que en el Pacífico abarca desde la frontera con Guatemala hasta el complejo hidrográfico Armaría-Coahuayana (Paulo-Maya, 1994).

Astyanax mexicanus posee una gran habilidad para adaptarse a diferentes hábitats, por lo que han colonizado exitosamente aguas subterráneas (Mitchell *et al.*, 1977). Presenta dos tipos de formas: un morfo superficial o epígeo con coloración y ojos bien desarrollados, y otro morfo de cueva o hipógeo, el cual es ciego y sin pigmentos (Figura 1A y B), siendo este último objeto de estudio para abordar fenómenos evolutivos tales como la convergencia (Wilkens, 1987). En México, actualmente se conocen 29 poblaciones de cueva en donde habita *A. mexicanus*, las cuales se encuentran en la región de la Sierra del Abra, entre los estados de Tamaulipas y San Luis Potosí (Protas *et al.*, 2006) y una más en el estado de Guerrero (Espinasa *et al.*, 2001). Además, es el único carácido que se dispersado hasta la región Neártica de forma natural, debido a su capacidad de soportar cambios de salinidad importantes y su alta tolerancia a cambios en las condiciones ambientales, pues en México se le ha encontrado en temperaturas cálidas que en ocasiones llegan a los 36°C o en arroyos de montaña donde la temperatura baja hasta los 13°C (Paulo-Maya, 1994)

Aunque la sardinita plateada no es una especie económicamente importante en términos de consumo directo, si puede ser una de las principales especies forrajeras para otras especies carnívoras, y ha sido introducida junto a la lobina negra (*Micropterus salmoides*), siendo esta ultima usada ampliamente para la pesca deportiva (Rico-Mora, 1984; Morales-Mejía, 1988). En cuanto a la forma hipógea, esta muestra mayor relevancia, pues se ha estudiado con mayor esmero, como los diversos aspectos y

mecanismos fisiológicos y genéticos que intervienen en la regresión o pérdida del ojo, por ejemplo los experimentos de trasplante del lente del ojo de peces de superficie a la copa óptica de peces de cuevas, para examinar el crecimiento y desarrollo de los tejidos ópticos (Yamamoto y Jeffery, 2000; Strickler *et al.*, 2007). Estas investigaciones han permitido generar conocimiento que en un futuro podría tener aplicaciones médicas. Por otra parte, las pequeñas cerdas presentes a lo largo de la línea lateral de los peces hipógeos han sido la inspiración para la elaboración de microsensores encapsulados, nanotecnología que encontrará diversas aplicaciones submarinas: como de vigilancia, detección temprana de tsunamis, inspección autónoma de instalaciones petrolíferas, navegación autónoma submarina o investigación marina (Peleshanko *et al.*, 2007; McConney *et al.*, 2008).

La taxonomía de especies en el género *Astyanax* es compleja (Contreras-Balderas y Lozano-Vilano, 1988); presenta morfos similares entre poblaciones donde los análisis de morfología tradicional (Paulo-Maya, 1994) y genética no han detectado poblaciones crípticas (Ornelas-García *et al.*, 2008). Así mismo, *Bramocharax caballeroi* (Figura 1C), cuya distribución se restringe al Lago Catemaco, mantiene la controversia si es un género distinto, o solo una variante más dentro de *Astyanax* (Ornelas-García *et al.*, 2008)

Los marcadores nucleares del tipo microsatélites son fragmentos de ADN que poseen diferentes números de repeticiones en tandem de mono, di, tri, y tetranucleótidos. Estas secuencias se encuentran rodeadas por regiones flanqueantes constituidas por secuencias anónimas que pueden ser usadas como iniciadores específicos para amplificar el segmento repetido o microsatélite mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés (Tautz, 1993). Debido a que este tipo de marcadores han sido ampliamente usados para abordar problemáticas de variación genética a nivel intraespecífico y son marcadores de alta tasa mutacional (Carlsson, 2008), en la presente investigación de tesis se utilizaron 10 loci que permitieron analizar la variabilidad genética a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana y evaluar la posible existencia de poblaciones genéticamente distintas.

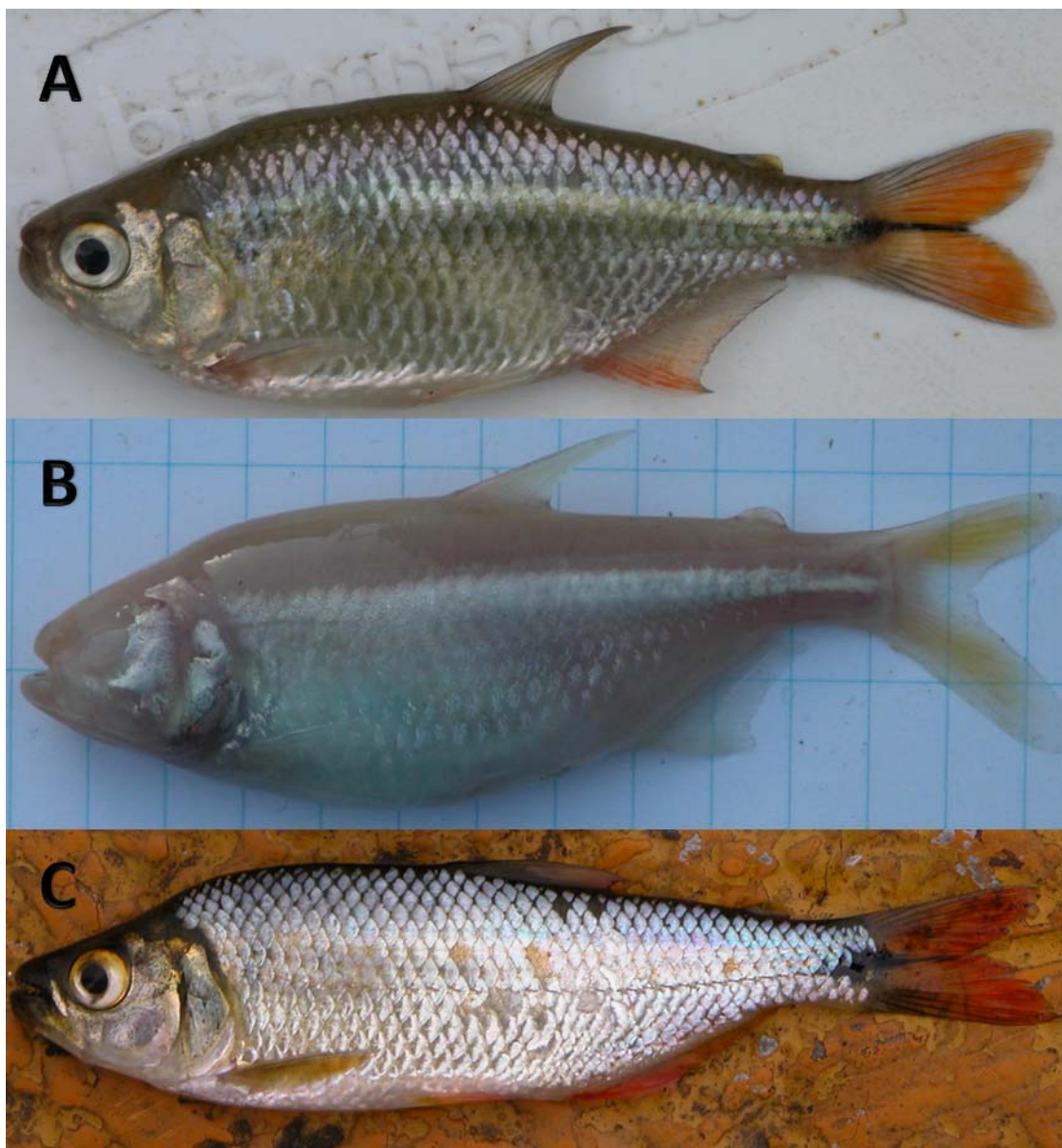


Figura1. A) Forma de superficie o epígea de *Astyanax mexicanus*, en la cual se observan ojos bien desarrollados y pigmentación. B) Forma de cueva o hipógea de *Astyanax mexicanus*, la cual no presenta ojos y tampoco coloración. C) *Bramocharax caballeroi*, de la localidad Lago Catemaco.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios morfológicos

El género *Astyanax* (Baird y Girard, 1854) en México ha sufrido varios cambios en su nomenclatura de especies debido en gran medida a que existen formas con enorme variabilidad e incontables nombres locales. Una de las revisiones acerca de esta problemática fue abordada por Lozano-Vilano y Contreras-Balderas (1988), en la cual los autores proponen cuatro especies (formas). La primera *Astyanax mexicanus*, se distribuye desde el centro de Texas (EUA) hasta Punta del Moro (Veracruz) en el Noreste de México; la segunda, *Astyanax aeneus* corresponde a las formas sureñas desde Punta del Moro (en el Atlántico) y desde la cuenca del Río Balsas (Pacífico) hasta Chiapas; una tercera, *Astyanax altior* la cual habita en los cenotes de la península de Yucatán y por último, *Astyanax armandoi* para la forma de arroyo y manantial alrededor de Pénjamo Chiapas. Sin embargo esta última “especie” de acuerdo al trabajo de Schmitter-Soto *et al.* (2008) corresponde a *A. aeneus*, siendo solo un ecotipo adaptado a ambientes de hipoxia ya que las características osteológicas, merísticas y morfométricas se encuentran dentro de la variación intra e interpoblacional de *A. aeneus*.

Otro trabajo para tratar de esclarecer esta problemática fue llevado a cabo por Paulo-Maya (1994) mediante un análisis morfométrico. En este trabajo, el autor encuentra que de los 24 caracteres analizados, 10 no resaltan diferencia entre poblaciones, 6 presentan un cambio de tipo gradual en las vertientes del Atlántico y Pacífico, solo 3 medidas de tipo morfométrico (distancias dorsal-adiposa, postdorsal y predorsal) y una de tipo merístico (escamas predorsales) pueden ser utilizadas como discriminantes, sin embargo falta discutir el significado biológico de las diferencias encontradas y de ser posible dar una explicación al origen de estas. Así mismo el autor menciona que las distintas especies nominales de *Astyanax* pueden tratarse de individuos representantes de un clinal morfológico, reflejo del ambiente, por lo que la mayoría de las especies nominales no representan taxa válidos, sino ejemplares de poblaciones con distribuciones geográficas poco separadas.

El estudio osteológico realizado por Valdez-Moreno (1997) de *Astyanax*, a lo largo de la vertiente Atlántica y del Pacífico arroja un árbol filogenético con tres grupos principales, el primero corresponde a la forma norteña (*Astyanax mexicanus*) cuya distribución va desde las cuencas del Río Bravo hasta Cucharas (Veracruz) incluyendo las formas del endorreico Río Nazas; el segundo grupo es de transición, presentando cambios graduales y comprende la zona entre el Río Solteros y el Río Antigua y el tercero representa las formas sureñas (*Astyanax aeneus*) cuya distribución va desde el Río Antigua hasta el Usumacinta en Chiapas.

Como se puede apreciar, los estudios morfológicos no han permitido definir unidades taxonómicas claras o coincidentes (varía de acuerdo al tipo de caracteres utilizados), por lo que se requiere de una revisión amplia de la variación morfológica del complejo de especies.

2.2 Estudios genéticos

Varios estudios se han enfocado en entender los mecanismos que dieron paso a la evolución de las formas troglobias, como lo son la regresión del ojo y la pérdida de pigmentación, haciendo de *Astyanax* un modelo especial, ya que presenta también a su conspecífico de superficie. Entre estos trabajos destacan los de Jeffery y Martasian (1998) y Jeffery *et al.* (2000a y b) los cuales abordan el rol que desempeñan los genes Pax-6, Prox 1y *hsp90α* durante la regresión del ojo en los organismos de cuevas.

Por otro lado, una gran parte de los estudios genéticos se han enfocado en los organismos de cuevas y sus conespecíficos de superficie en la región de la Sierra del Abra, la cual se encuentra entre los estados de Tamaulipas y San Luis Potosí (Figura 2). Los primeros estudios se enfocaron en los cruzamientos de individuos de cuevas y superficie, así como entre distintas cuevas, observando las características del desarrollo del ojo y pigmentación presentes en los descendientes F1 y F2. Dado que los individuos de diferentes cuevas presentaban diferentes grados de desarrollo del ojo, se propuso que las mutaciones de diferentes genes están involucradas en el proceso conocido como la regresión del ojo (Sadoglu, 1957; Wilkens, 1971). Debido a lo anterior, Wilkens y Strecker (2003), realizaron cruza entre poblaciones de cuevas, observando que los híbridos poseen ojos más grandes y mejor desarrollo de los órganos oculares y células

visuales, y que en los casos en donde estos genes no funcionales se recombinan en especímenes híbridos, la expresión del gen puede ser restaurada. En base en estas evidencias los autores concluyeron que esto es el resultado de una evolución independiente entre las poblaciones de cuevas.

Con el advenimiento del uso de isoenzimas Avise y Selander (1972) evaluaron la variación de estas entre organismos de superficie y los de cuevas, encontrando que la variabilidad genética en poblaciones de superficie es elevada, mientras que en las cuevas es ausente o severamente reducida. En el 2001 Espinasa y Borowsky utilizando RAPD's (Polimorfismo del ADN por amplificación al azar) en la región de la Sierra del Abra encuentran que las poblaciones de cuevas están más estrechamente relacionadas entre sí que con las de su contraparte de superficie, sugiriendo que las poblaciones de cuevas en esta sierra derivan de una población ancestral común, y que en algún momento hubo un fuerte flujo genético entre las cuevas. Así mismo, las poblaciones de las cuevas de Micos (al suroeste de la Sierra de Colmena, Figura 1) son de origen independiente y filogenéticamente más jóvenes que los de la Sierra de El Abra, no obstante el soporte estadístico de sus resultados no fue robusto.

Posteriormente, Dowling *et al.* (2002) utilizando la técnica de SSCP (Polimorfismo conformacional de cadena sencilla) para el gen ND2 (NADH deshidrogenasa 2) del ADN mitocondrial, encontraron al menos dos linajes distintos para la región de la Sierra del Abra, con mayor grado de divergencia que con sus contrapartes del sur de México, proponiendo la hipótesis de dos o más eventos fundador que dieron lugar a morfologías convergentes derivadas a partir de ancestros epígeos distintos.

Strecker *et al.* (2003) utilizando seis loci microsátélites y el gen del Citocromo b (Cyt b), en cuatro poblaciones de cuevas (Pachón, Sabinos, Tinajas y Chica) y cuatro poblaciones de superficie (dos dentro de la Sierra del Abra y dos en el estado de Quintana Roo) encuentran que la divergencia entre las poblaciones de cueva y superficie de la misma localidad es mayor que la divergencia presente entre las poblaciones de superficie alrededor de las cuevas y las que se encuentran en el estado de Quintana Roo (a más de 1000km de distancia), proponiendo al igual que Dowling *et*

al. (2002), que existieron al menos dos eventos fundador independientes, sin embargo no consideraron todas las poblaciones intermedias entre Tamaulipas y Quintana Roo.

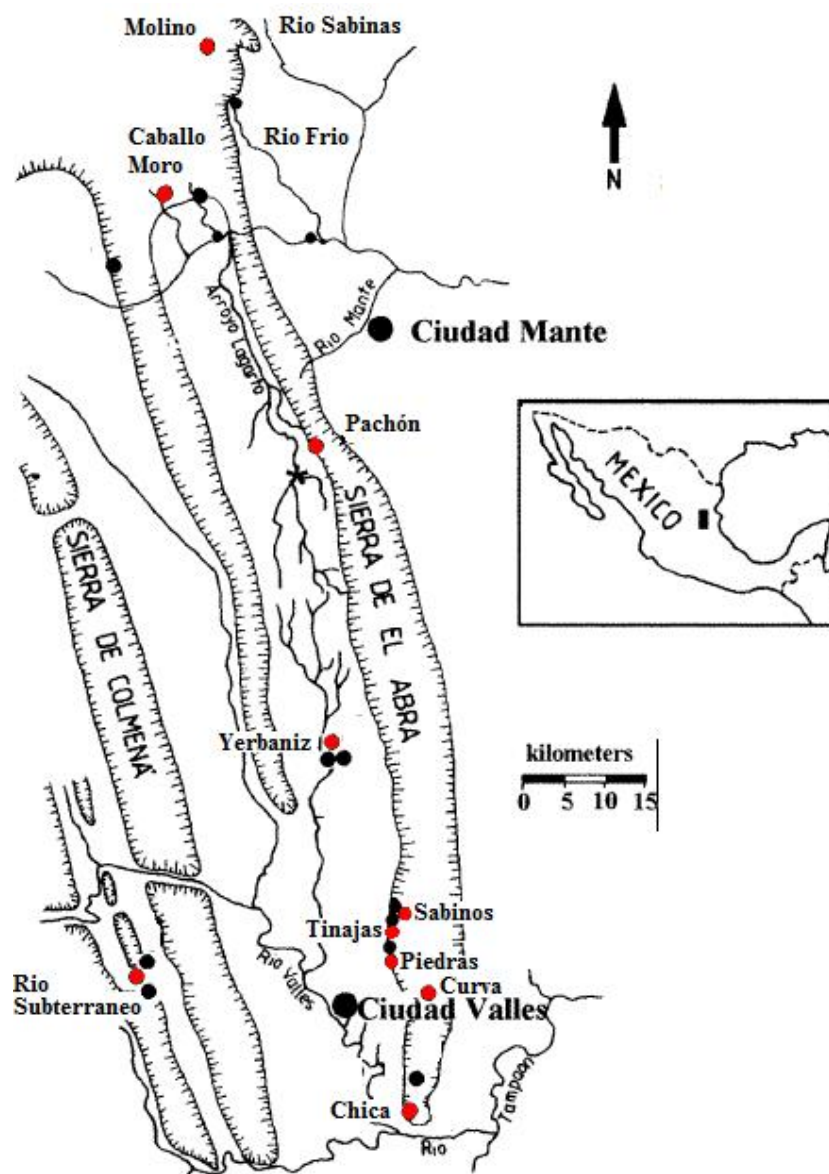


Figura 2. Mapa de la región de la Sierra del Abra. En esta figura se muestra la ubicación de las diferentes cuevas, destacándose con puntos en rojo aquellas que han sido más estudiadas.

En el 2004 Strecker y colaboradores utilizando el gen Cyt b a lo largo de la vertiente Atlántica (cuevas en la Sierra del Abra, Río Papaloapan, Río Coatzacoalcos, Campeche, Yucatán y Quintana Roo) la parte sur del Pacífico (Oaxaca) incluyendo Belice y Guatemala, encuentran siete linajes distintos. Nuevamente hallan dos linajes

diferentes para las cuevas del noroeste de México, reforzando la hipótesis de dos eventos de dispersión de *Astyanax*, donde la primera ola de dispersión estaría representada por los individuos de las cuevas de Sabinos, Tinajas, Piedras y Curva, mientras que la segunda ola está compuesta por el resto de las cuevas y las poblaciones superficiales del noreste de México. Los autores proponen que durante el Pleistoceno o quizás en el Plioceno tardío el enfriamiento climático de las aguas superficiales llevaron a la extinción de *Astyanax* en Norte América, donde las poblaciones más sureñas de Belice y las cuevas antes mencionadas funcionaron como refugios, cuando el ambiente empezó de nuevo a calentarse hace aproximadamente 1.6 millones de años la invasión remonto de nuevo al norte

Por su parte Ornelas-García *et al.* (2008) mediante un muestreo a lo largo de las dos vertientes mexicanas (Atlántica y Pacífico) hasta Panamá (excluyendo Honduras) y empleando tres marcadores mitocondriales (Cyt b, COI y 16S) y uno nuclear (RAG1), hacen una reconstrucción filogenética del género *Astyanax* y al igual que los estudios anteriores encuentran dos linajes para la parte noreste de nuestro país. Además en su trabajo incluyen al género *Bramocharax*, el cual se cree puede ser solo una variación de *Astyanax* debido a que son morfológicamente muy parecidos. Sus resultados demuestran que no existe monofilia para el género de *Bramocharax*, además de presentar bajos niveles de diferenciación genética con el género *Astyanax*, por lo tanto, esta última se considera un morfotipo dentro el rango de plasticidad morfológica de *Astyanax*, dada la evidencia de evolución recurrente del morfotipo de *Bramocharax* dentro de la filogenia del complejo *Astyanax* (Figura 3). Por otro lado, Ornelas-García *et al* (2008) proponen una nomenclatura para los nombres específicos de *Astyanax* en base a tres criterios: 1) grupos monofileticos bien definidos, 2) alta divergencia genética en el fragmento de citocromo b (>2%), y 3) patrón de distribución geográfica. Así por ejemplo, en la región de la Sierra del Abra, según ellos habría dos especies, *A. hubbsi* localizada en las cuevas de Sabinos, Tinajas, Piedras y Curva así como en los Ríos Aguanaval y Mezquital (Durango), y *A. mexicanus* distribuida en el resto de la parte noreste de México. Sin embargo Hausdorf *et al.* (2011) usando 6 marcadores microsátélites, invalidan esta propuesta argumentando que los datos microsatelitales de los individuos de la cueva de Pachón pertenece al mismo grupo genotípico nuclear que las cuevas de Sabinos y Tinajas, siendo estas últimas integrantes de la primera ola de

colonización de *Astyanax* en Norteamérica. Resulta interesante ya que los individuos de la cueva de Pachón presentan, según Ornelas-García *et al.* (2008) un haplotipo mitocondrial correspondiente a la segunda ola de colonización de *Astyanax* en Norteamérica. Para resolver este conflicto en los patrones de variación nuclear y mitocondrial, Hausdorf *et al.* (2011), proponen que los individuos de la cueva de Pachón pertenece a la primera ola de colonización y el hecho de presentar un haplotipo mitocondrial de tiempo reciente se debe a la introgresión de las poblaciones de superficie cercanas, lo cual también proponen para los individuos de las cuevas de Yerbaniz y Molino. Aparentemente este evento de introgresión mitocondrial ha sido recurrente en *Astyanax*. La carencia de congruencia entre las distribuciones de agrupamientos genotípicos nucleares y clados mitocondriales demuestra que los individuos con haplotipos mitocondriales más antiguos no son una unidad evolutiva independiente y por lo tanto no pueden ser clasificados como especies separadas (Hausdorf *et al.*, 2011).

Es remarcable la falta de estudios sobre las poblaciones de superficie a lo largo de las dos vertientes mexicanas con el uso de marcadores moleculares de tasa mutacional alta (por ejemplo microsatélites) que puedan ayudar a establecer mejor las relaciones genéticas entre las distintas poblaciones a una escala de tiempo más reciente. La falta de atención en el escrutinio genético y morfológico de las poblaciones a lo largo de la cuencas de la vertiente Atlántica, solo resalta la incertidumbre sobre las relaciones genéticas entre las poblaciones que pudieran confundir las conclusiones hasta ahora obtenidas.

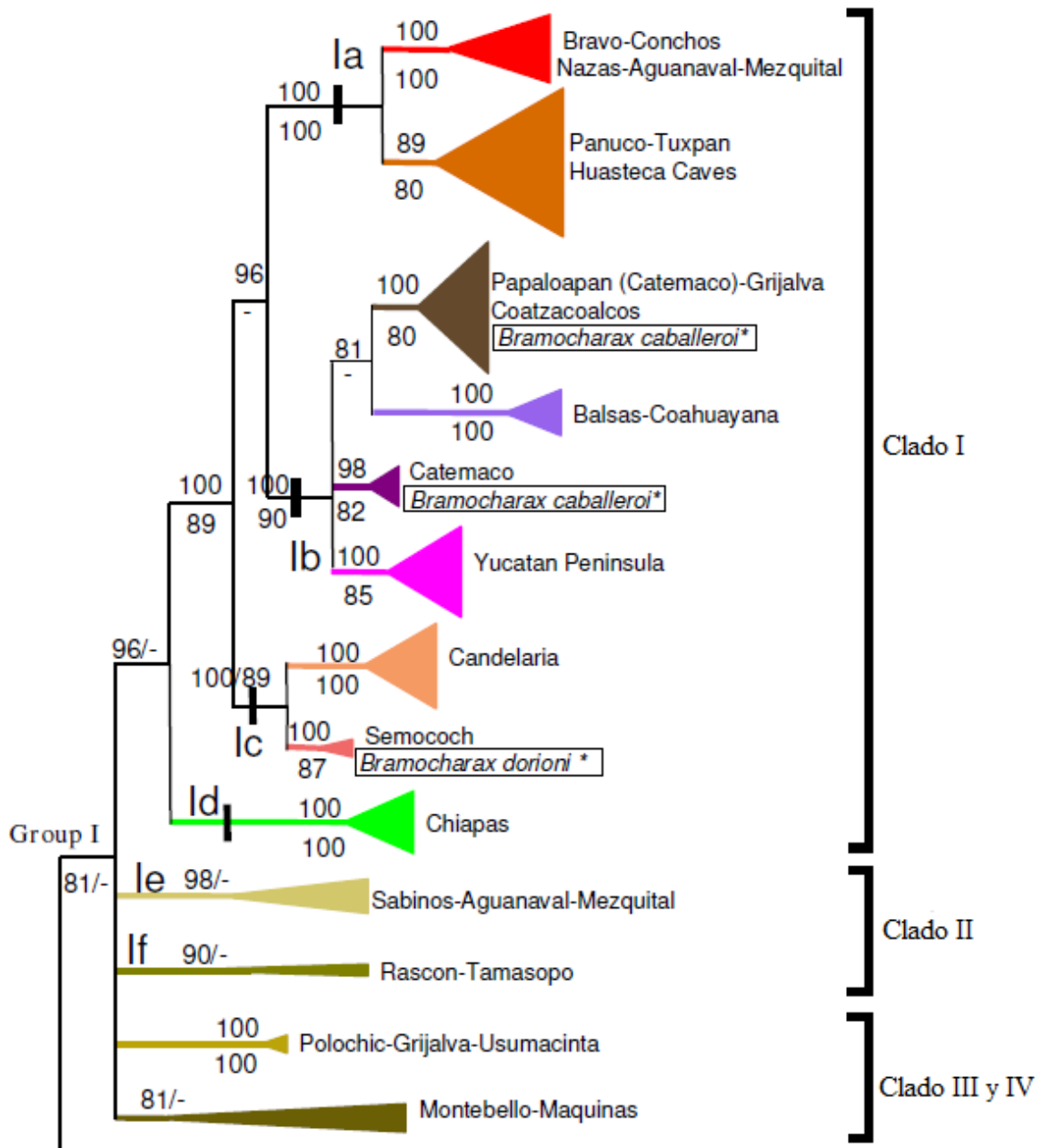


Figura 3. Parte superior del árbol realizado por Ornelas-García *et al.* (2008) con los marcadores de Cyt b, COI, 16S y RAG1, en el cual se observa como los individuos pertenecientes al género *Bramocharax* aparecen dentro de las diferentes ramas de *Astyanax*, no formando así un grupo monofilético.

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios se han enfocado a estudiar las poblaciones de cuevas y sus conespecíficos de superficie cercanas a éstas, no solo con el fin de tratar de entender sus relaciones filogenéticas y biogeográficas, sino porque este grupo de peces se puede mantener fácilmente en cautiverio, pudiéndose hacer cruzas entre los dos morfotipos (hipógeo y epígeo). Esto ha permitido el desarrollo de diversos estudios en genética y del desarrollo (e.g. Yocoyama y Yocoyama, 1990; Jeffery y Martasian, 1998; Jaffery y Yamamoto, 2000; Jeffery *et al.*, 2000; Yamamoto y Jeffery, 2000), que permitan conocer los mecanismos y genes responsables en la degeneración del ojo en las poblaciones de cuevas, lo que podría en un futuro tener una aplicación médica.

Por su parte, los estudios de estructura poblacional en *Astyanax mexicanus* se han enfocado principalmente a las poblaciones de cuevas y sus conespecíficos de superficie cercanas a estas, y los más extensivos revelan muestreos incompletos a través de la amplia distribución de la especie a lo largo de la vertiente Atlántica mexicana, de tal forma que las interpretaciones podrían ser erróneas. Por lo tanto, el uso de una batería de 10 loci microsatélites y el aumento de la cobertura de muestreo a lo largo de las principales cuencas hidrológicas en la vertiente Atlántica, podrá proveer una perspectiva más clara sobre la diversidad genética, estructura y relaciones genéticas entre las distintas poblaciones de *Astyanax*. Cabe señalar que debido a los resultados mostrados por Ornelas-García *et al.* (2008; figura 2), el presente trabajo también incluyó muestras de *Bramocharax caballeroi* del Lago Catemaco, ya que parece ser una variación morfológica adicional dentro del género *Astyanax*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la diversidad genética y estructura poblacional de *Astyanax mexicanus* mediante el uso de marcadores tipo microsatélites a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la identidad de los individuos colectados a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana con ayuda de claves taxonómicas.
- Estimar el número de poblaciones existentes a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana.
- Analizar la estructura genética de las poblaciones epígeas e hipógeas de *Astyanax mexicanus* en la vertiente Atlántica Mexicana.
- Determinar el grado de flujo genético entre las poblaciones epígeas e hipógeas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana.
- Verificar si existe un patrón de aislamiento por distancia entre las distintas poblaciones epígeas e hipógeas.
- Analizar la diversidad genética de las poblaciones epígeas e hipógeas de *Astyanax mexicanus* a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana.
- Contribuir al conocimiento de las relaciones genéticas entre las poblaciones de *Astyanax mexicanus*.

5. HIPOTESIS

H1: Debido a las características biológicas de *Astyanax mexicanus* como lo son la alta capacidad de reproducción y adaptación a distintos ambientes, se espera que presente una variabilidad genética alta, a excepción de las poblaciones de cuevas, las cuales al ser poblaciones pequeñas y aisladas se espera presenten una variabilidad genética menor (debido principalmente al efecto de la deriva génica), así como diferenciación genética entre las localidades muestreadas.

H2: El uso de marcadores de alta tasa mutacional, como lo son los microsatélites deberán reflejar al menos dos eventos fundador por parte de *Astyanax* en dirección sur-norte, como se ha propuesto en trabajos anteriores.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Área de estudio

El área de estudio del presente trabajo corresponde a la vertiente Atlántica de México, la cual incluye los estados de Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco y Chiapas, dentro de las cuales se analizaron las siguientes cuencas: Ríos Bravo, San Fernando, Soto la Marina, Pánuco, Tuxpan, Papaloapan y Sistema Grijalva-Usumacinta (Tabla I y Figura 4).

Tabla I. Coordenadas de las localidades muestreadas, número de individuos colectados, cuenca a la que pertenecen las localidades, fecha de colecta y acrónimo

Localidad	Acrónimo	# de Ind.	Latitud	Longitud	Cuenca Hidrológica	Fecha de Colecta
Cuatrociénegas	CC	26	26.878	102.137	Río Bravo	10-Jun-09
San Fernando	SF	30	24.431	98.431	San Fernando	25-Ene-04
Garza Valdez	GV	24	24.711	99.384	Soto la Marina	24-Ene-04
Troncones	TR	40	23.723	99.308	Soto la Marina	22-Dic-02
Arroyo Lagartos	AL	36	22.804	98.941	Pánuco	23-Mar-03
Cueva Molino	ML	15	23.626	99.114	Pánuco	08-Mar-08
Cueva Pachón	PCH	44	22.607	99.044	Pánuco	04-Mar-08
Cueva Sabinos	SAB	23	22.024	98.9	Pánuco	18-Abr-01
Cueva Tinajas	TIN	12	21.968	98.902	Pánuco	04-Feb-01
La Cañada	LCA	26	21.867	99.151	Pánuco	05-Abr-06
Huchihuayan	SLP	19	21.479	98.966	Pánuco	19-Ago-04
El Zapotal	V	30	21.276	98.146	Tuxpan	09-Abr-04
Catemaco	CAT	26	18.433	95.032	Papaloapan	16-Sep-04
Teapa	TE	50	17.426	92.751	Grijalva-Usumacinta	22-Ene-08
Tapijulapa	TA	27	17.45	92.75	Grijalva-Usumacinta	12-Ene-06
Río Tzendales	RTZ	41	16.216	90.8411	Grijalva-Usumacinta	15-Ene-06

6.2 Trabajo de campo

Las colectas de individuos para este trabajo fueron hechas entre el 2001 y 2009, con un total de 16 localidades. Los organismos del Estado de Coahuila, fueron proporcionados por el Dr. Dean Hendrickson bajo el proyecto de investigación “Análisis de Diversidad de Peces” en Cuatro Ciénegas, Coahuila, los cuales pertenecen al sistema del Río Bravo.

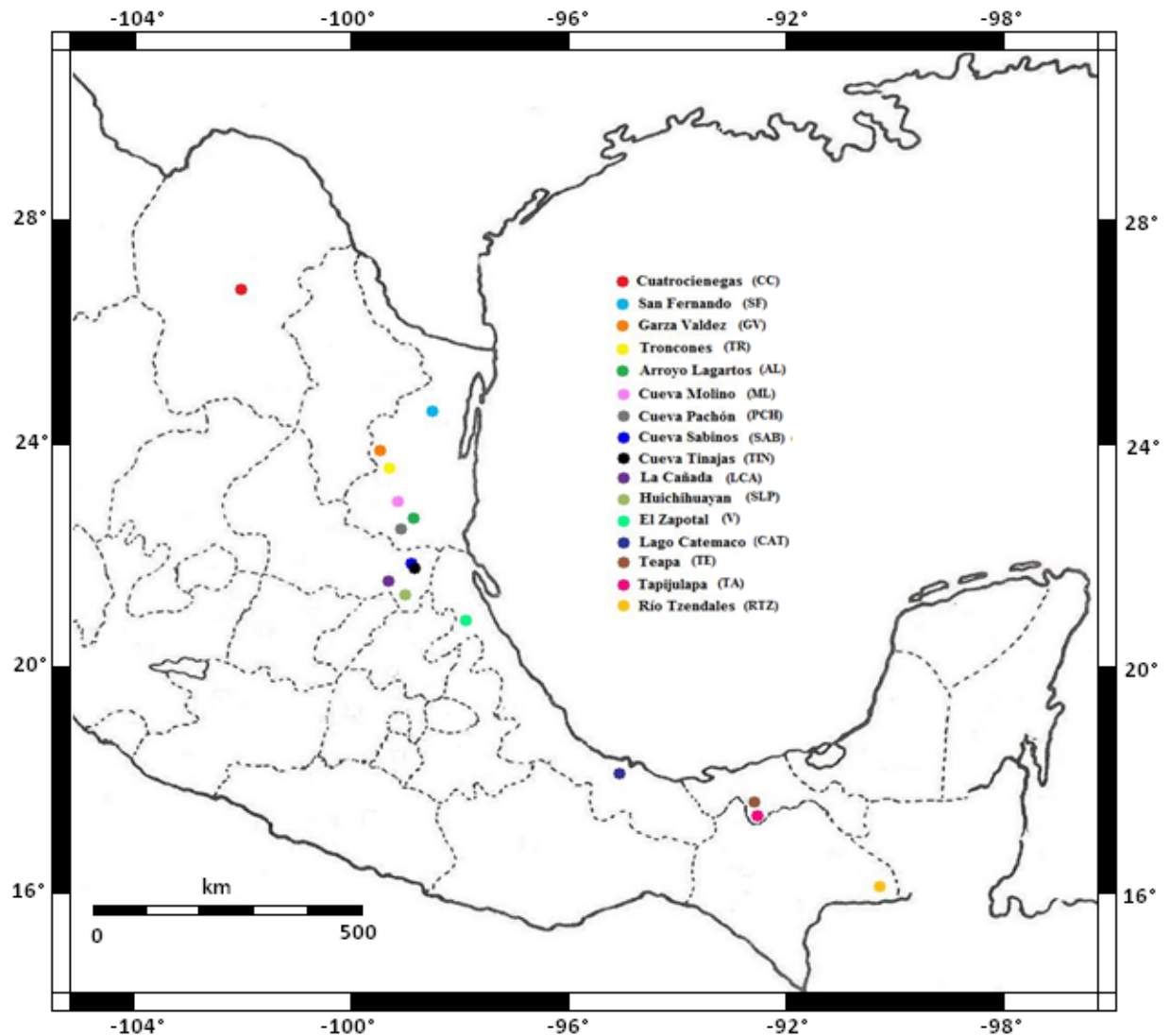


Figura 4. Mapa de las localidades donde se hicieron las colectas de *Astyanax mexicanus* a lo largo de las distintas cuencas en la vertiente Atlántica Mexicana durante el periodo 2000-2009.

En el Estado de Tamaulipas se colectaron individuos pertenecientes a las localidades de San Fernando (de la cuenca San Fernando), Ejido Garza Valdez en el Río Pilon y Troncones en el Río San Felipe (ambas pertenecientes al Sistema Soto la Marina), y en el Arroyo Lagartos perteneciente al Sistema del Pánuco. Todas estas muestras fueron obtenidas por el grupo de estudiantes del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria asesorados por el Dr. Francisco García de León. Los peces ciegos de las cuevas de El Molino y Pachón fueron colectadas por Sarai Esquivel y el Dr. Francisco García de León en colaboración con el Dr. Richard Borowsky de la Universidad de Nueva York.

Para el estado de San Luis Potosí, los organismos de la localidad de Huichihuayan en el Río Huichihuayan, fueron proporcionados por el Dr. Gil, G. Rosenthal (Universidad de Texas A&M), y el resto fueron colectados en la localidad de La Cañada en el Río Tanchanchia, ambas localidades pertenecientes al sistema del Pánuco. Los peces ciegos colectados en las cuevas de Sabinos y Tinajas fueron hechas por el grupo de estudiantes del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria asesorados por el Dr. Francisco García de León.

Las muestras del estado de Veracruz fueron colectadas en la localidad el Zapotal en el Arroyo Chiote, el cual pertenece al Sistema Tuxpan y en el Lago Catemaco, el cual pertenece al Río Papaloapan, también fueron colectados por estudiantes del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria.

Los organismos del estado de Tabasco fueron colectados en las localidades de Tapijulapa en el Arroyo Cristal y en la localidad de Teapa en el Arroyo Bonita por el Dr. Ingo Schlupp (Universidad de Oklahoma) y el Dr. Francisco García de León, mientras que los organismos del estado de Chiapas fueron colectados en el Río Tzendales y proporcionados por el M en C. Héctor Espinosa de la UNAM, siendo todas las anteriores pertenecientes al sistema Grijalva-Usumacinta.

Las artes de pesca utilizadas en las colectas realizadas fueron con chinchorro playero de 3 x 1.5” de abertura de malla y electropesca marca Smith-Root modelo 15D. Los individuos fueron preservados en alcohol al 96% y etiquetados con sus datos correspondientes.

6.3 Trabajo de laboratorio

6.3.1. Identificación de individuos

Los ejemplares de *Astyanax* empleados para los análisis genéticos fueron identificados usando las principales características morfológicas que permiten identificar a las especies/morfos. Dichos caracteres fueron el número de branquioespinas de la parte inferior del primer arco branquial, el número de radios de la aleta pectoral y aleta anal, y el número de escamas de la línea lateral (Lozano-Vilano y Contreras-Balderas, 1990). Para la identificación de *Bramocharax caballeroi*, se usaron también las características

arriba mencionadas, además de contarse el número de dientes maxilares y mandibulares así como las cúspides de estos, ya que son características que lo diferencian de *Astyanax* (Contreras-Baleras y Rivera-Teillery, 1976); para su comparación con respecto a *Astyanax*, se tomaron cuatro individuos al azar del resto de las localidades para la revisión de dientes. Cabe señalar que no se contó con los individuos, para las localidades de Garza Valdez, Arroyo Lagartos y El Zapotal para este análisis.

Posteriormente, con un total de 469 individuos/tejidos se prosiguió con: 1) extracción de ADN total, 2) estandarización de los microsatélites vía PCR y 3) genotipificación de los individuos.

6.3.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN total se utilizaron dos métodos, el primero fue mediante un KIT comercial marca QUIA-GEN, y el otro fue una versión ligeramente modificada del protocolo estándar de extracción Fenol-Cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) (Anexo I). La extracción de ADN y su calidad se verificó vía electroforesis en geles de agarosa al 1% (buffer TAE 1X, 10 mg/L de bromuro de etidio) por 50 minutos a 100 voltios y se cuantificó su concentración con ayuda de un biofotómetro marca Eppendorf. Los geles fueron visualizados y documentados con ayuda de un fotodocumentador ChemiDoc Gel Documentation System, marca Bio-Rad, modelo 2000TM (Figura 1 del Anexo I)

6.3.3. Estandarización de microsatélites vía PCR

Para esta parte, se utilizó una batería de 10 loci microsatélites, 3 de los cuales están descritos por Strecker (2003) (Ast02, Ast09 y Ast10) y el resto (V-c10, A14-d12, W-f6, X-a3, V-f9, L-b9 y V-F3) están descritos en Protas *et al.* (2006). Estos loci fueron escogidos por estar en grupos de ligamiento independientes, para evitar problemas con el desequilibrio de ligamiento (Protas *et al.*, 2006)

La estandarización de las condiciones de PCR para amplificar los microsatélites arriba mencionados se muestran en la Tabla II. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 15µl por reacción en un termociclador DNA Engine marca Bio-Rad de 96 plazas.

6.3.4. Genotipificación de individuos

Después de la amplificación de los loci microsatélites, los productos PCR fueron separados por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se realizó en una cámara vertical utilizando geles de acrilamida al 6%, los cuales fueron corridos a 1700V, 40mA, 45W durante 2.5 horas. La visualización de las bandas se hizo mediante la técnica de tinción en plata (Bassam y Caetano-Anolles, 1993, Anexo II).

Posteriormente los geles fueron digitalizados y se utilizó el programa Gel Analyzer de Sequentix (<http://www.sequentix.de/>) para determinar las tallas alélicas, las cuales fueron capturadas en una base de datos, la cual se encuentra disponible en el laboratorio de Genética para la Conservación (CIBNOR).

Tabla II. Iniciadores, condiciones y programas de amplificación que fueron empleados para cada uno de los *loci* microsatélites (Strecker, 2003^a, Protas *et al.*, 2006^b)

Locus	Oligonucleótidos (5'-3')	Condiciones de Amplificación	Programa de Amplificación
Ast02 ^a	F-GAGGGTCTGATGTAAGTGA R-CGAACCCGAGAACTG	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.5.mM dNTPs 0.2mM iniciadores 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min 30c 57°C/30s 72°C/30s 72°C/5min
Ast09 ^a	F-TCCACAATAGACTCGGAAAGAATC R-GACAAAAGAGGCTTCCATGAACT	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.5.mM dNTPs 0.2mM iniciadores 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min 30c 60°C/30s 72°C/30s 72°C/5min
Ast10 ^a	F-ACAGAAACACGTTGATGTATGGC R-CAAAGTACTGACTGAGTGAGC	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.0.mM dNTPs 0.2mM iniciadores 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min 30c 53°C/30s 72°C/30s 72°C/5min
V-c10 ^b	F-TTTCCAATATTGCCAGCC R-GACTGACCTCCCACAAGGG	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.5.mM dNTPs 0.2mM iniciadores 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min 30c 56°C/30s 72°C/30s 72°C/5min
A14-d12 ^b	F-CTGCAATGAACACTCAGCG R-TCCTCCTCGTCACATATAGGC	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.5.mM dNTPs 0.2mM iniciadores 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min 30c 56°C/30s 72°C/30s 72°C/5min

Continuación Tabla II.

Locus	Oligonucleótidos (5'-3')	Condiciones de Amplificación	Programa de Amplificación
W-f6 ^b	F-CATAATGTAAAGTGCGGGGG R-TCACCTCCTATTAGCTCACGC	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.5.mM dNTPs 0.2mM iniciadores 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min
X-a3 ^b	F-TTTTCAGGGTCCAGTAACGC R-CCAGACCATCAAGAAGACGG		30c 52°C/30s 72°C/30s
V-f9 ^b	F-ATGTGGTGAAACTGATTGGC R-ACAGCACCTCCCTCGACCC		72°C/5min
L-b9 ^b	F-ACAACATCAGCAAGTTCCCC R-ATGGCACTCGATTACAGCG	Buffer 1.0x MgCl ₂ 2.5.mM dNTPs 0.2mM primers 0.4μM c/u Taq Pol 1.0 U	95°C/5min 95°C/1min
V-F3 ^b	F-CTCACGAGTCAGCATTTC R-TCAACTTGCATAGACAGGGC		30c 55°C/30s 72°C/30s 72°C/5min

6.4 Análisis de datos

6.4.1 Identificación de individuos mediante distancias genéticas.

El cálculo de la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) con base en las frecuencias alélicas fue empleado en las poblaciones de superficie analizadas morfológicamente (Cuatrociénegas, San Fernando, La Cañada, Huichihuayan, Teapa, Tapijulapa, Río Tzendales y Catemaco), con la finalidad de que esta distancia permita observar la separación de *Astyanax mexicanus* y *Astyanax aeneus*, y así como la de estos con respecto a *Bramocharax*, la cual se espera sea mayor, ya que es una diferencia de géneros.

El cálculo de esta distancia se llevo a cabo en el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004).

6.4.2 Determinación del número de poblaciones

Para este apartado se utilizaron diversos métodos y programas que ayudaron a identificar la estructura poblacional de *Astyanax mexicanus* a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. A continuación se describen cada uno de ellos.

6.4.2.1. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC)

El AFC, es un análisis es de tipo canónico multivariado, que se empleo como un estudio exploratorio para estimar el número de poblaciones o agrupaciones. Este análisis consiste en una tabla de contingencia donde se cruzan las modalidades de dos variables, las cuales están representadas por las frecuencias alélicas de las poblaciones, así pues el AFC localiza de acuerdo a su juego de características genéticas, a cada individuo en un hiperespacio de tantas dimensiones como modalidades, lo que permite expresar la tendencia de un elemento dado, ya sea un individuo o un alelo, que totaliza la inercia explicada por un factor y la que se representa en una nube de puntos. Dicho análisis se realizó con el paquete estadístico GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004).

6.4.1.2 Índices de Fijación de Wright

Los índices de fijación de Wright (1951) fueron desarrollados para describir poblaciones naturales subdivididas, a partir de la fórmula $F = 1 - (H_o | H_a)$, donde H_o es la heterocigocidad observada y H_a es la heterocigocidad calculada al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Estos índices son tres y están en sucesión jerárquica en términos de: Individuos (F_{IS}), subdivisiones poblacionales (F_{ST}) y población total (F_{IT}). En este estudio se calcularon los valores de F_{ST} según Weir y Cockerham (1984) para estimar las divergencias genéticas entre las poblaciones, estos valores van de 0 a 1, donde 0 refleja la no diferenciación entre poblaciones, mientras que 1 expresa la máxima diferenciación. Los cálculos se hicieron por pares de poblaciones utilizando el programa de GENETIX 4.05 (Balkhir *et al.*, 2004), así mismo se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia en pruebas múltiples (Rice, 1989).

6.4.1.3 Flujo genético

Otro parámetro analizado fue el grado de flujo genético en las poblaciones, el cual se define como la transferencia de material genético entre las distintas poblaciones, como resultado del movimiento de los individuos o sus gametos. Para la estimación de número de migrantes por generación se utilizó el modelo de isla propuesto por Wright (1978), el cual considera una relación entre los migrantes que recibe una población por generación con los valores de F_{ST} a partir de la fórmula $Nm = (1 - F_{ST}) / 4 * F_{ST}$, asumiendo equilibrio de migración y deriva. La estimación de Nm se realizó de manera pareada entre las localidades en el paquete estadístico GENETIX 4.05 (Balkhir *et al.*, 2004)

6.4.1.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Este análisis se utilizó para determinar la cantidad de variabilidad genética contenida dentro y entre las poblaciones. Para ello se utilizaron varios modelos de agrupación bajo distintos criterios, con la finalidad de maximizar la varianza entre los grupos y así develar la estructura genética contenida en nuestros datos. Este análisis se llevo a cabo en el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) y los modelos de agrupación se describen a continuación:

- A) Cada localidad de recolecta se consideró como unidades distintas (CC, SF, GV, TR, AL, ML, PCH, SAB, TIN, LCA, SLP, V, CAT, TE, TA y RTZ).
- B) Las localidades se agruparon por grupos filogenéticos, basándose en los resultados obtenidos de Ornelas-García *et al.* (2008) [(CC), (SF, GV, TR, AL, ML, PCH, LCA, SLP, V), (SAB, TIN), (CAT), (TE, TA, RTZ)].
- C) Las localidades se agruparon por cuencas hidrológicas [Bravo (CC), San Fernando (SF), Soto la Marina (GV, TR), Pánuco (AL, ML, PCH, SAB, TIN, LCA, SLP), Tuxpan (V), Papaloapan (CAT), Grijalva-Usumacinta (TE, TA, RTZ)].
- D) Las localidades se agruparon de acuerdo a su grado de diferenciación genética medida por los F_{ST} , agrupando aquellas poblaciones que mostraron niveles de diferenciación no significativos [(CC), (SF), (GV, TR), (AL, LCA, SLP), (V), (PCH), (ML), (SAB, TIN), (CAT), (TE, TA, RTZ)].

En cada uno de estos análisis se empleo un total de 10,000 permutaciones.

6.4.1.5 Determinación del número de poblaciones mediante probabilidades bayesianas

Otro método para detectar el número de poblaciones (K) es mediante la utilización de probabilidades bayesianas a partir de los genotipos de múltiples loci de cada individuo. Para esto, se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Pritchard, 2007). Este programa parte del supuesto de que las poblaciones se encuentran en EHW, ya que cada alelo en cada locus y en cada genotipo es un evento independiente de la distribución de las frecuencias apropiadas, obedeciendo a una distribución de probabilidades $\Pr(X|ZP) \propto \Pr(Z) \Pr(P) \Pr(X|Z,P)$, donde X hace referencia al genotipo de los individuos, Z representa el número de poblaciones o grupos de origen de los individuos y P denota las frecuencias alélicas en todas las poblaciones o grupos formados, cada una de las variables representa un vector dimensional (X,Z,P) . Así, a partir de estas probabilidades se utilizan las Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para inferir Z y P en base a las probabilidades *a posteriori*. Se empleó el modelo de mezcla de poblaciones con 10,000 réplicas durante el periodo de pre-simulación, mientras que los valores de probabilidad fueron calculados después de 100,000 réplicas y el valor de K tomó valores de 1 a 12 con 10 iteraciones para cada valor de K .

Posteriormente se realizó el cálculo del estadístico ΔK en línea (http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/) (Earl, 2011), ya que es el método adecuado para detectar el número de grupos reales para datos simulados bajo modelos de intercambio genético (Evanno *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) y verificados con el estadístico de Evanno (Evanno *et al.*, 2005) en cuanto al número de grupos formados fueron graficados empleando el programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004), el cual muestra a cada individuo como una línea formando parte de un segmento que se encuentra dividido en K colores que representa la probabilidad o coeficiente de que cada individuo pertenezca al grupo que se le asignó.

6.4.3 Reconstrucción de dendrogramas

6.4.3.1 Estimación de distancias genéticas

Para este apartado, se utilizó el estimador de distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), el cual se basa en una medida de distancia geométrica que calcula las distancias de la cuerda o recta en un espacio cartesiano (D_{CE}) según la ecuación:

$$D_C = \left(\frac{2}{\pi r}\right) \sum_f^r \sqrt{2 \left(1 - \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}}\right)}$$

Así pues, si se representa a dos poblaciones en la superficie de un hiperespacio multidimensional usando las frecuencias alélicas de los locus j th, entonces la D_{CE} de ese locus estará representada por la distancia de la cuerda entre las dos poblaciones, donde el ángulo (θ_j) de las dos poblaciones está representado por la siguiente fórmula:

$$\theta_j = \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}}$$

Esta distancia no hace ningún supuesto respecto a una talla de población constante o tasas de mutación entre *loci*. La magnitud de esta distancia no es proporcional al tiempo evolutivo, pero es generalmente usada para estimar con mayor probabilidad la correcta topología de los árboles entre especies o poblaciones estrechamente relacionadas sin asumir ningún modelo mutacional (Nei y Takezaki, 1996). Las distancias se realizaron con el programa de PHYLIP 3.6 (Felstein, 2001).

6.4.3.2 Construcción del dendrograma

Basados en las matrices de distancias calculadas, se hizo la construcción del cladograma bajo el modelo del vecino más cercano (Neighbour-Joining, N-J; Saitou y Nei, 1987), incluido en el programa PHYLIP 3.69 (Felstein, 2001). Para estimar la confianza o robustez de la topología del árbol obtenido se realizó un bootstrap de 10,000 permutaciones compilado en el paquete CONSENSE incluido en el programa PHYLIP 3.6 (Felstein, 2001).

6.4.4 Aislamiento por distancia

Este análisis está basado en el hecho de que los individuos de una población tendrán mayor probabilidad de reproducirse con individuos de poblaciones cercanas que con aquellos que se encuentran en poblaciones más distantes. Como resultado de esta tendencia, las poblaciones geográficamente cercanas serán genéticamente más semejantes que con aquellas que se encuentran a mayor distancia. Para esto se hizo una correlación entre las distancias geográficas con las distancias genéticas, para lo cual se utilizó el programa en línea ISOLDE el cual está incorporado en el programa GENEPOP en línea (Raymond y Rousset, 1995; <http://genepop.curtin.edu.au/>). Esta prueba considera las distancias geográficas en kilómetros y los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$). Se utilizaron 10,000 permutaciones para calcular el valor estadístico bajo la hipótesis nula de independencia entre las dos variables, que en este caso es la distancia geográfica y distancia genética.

Para este apartado, se hicieron cuatro pruebas de Mantel. La primera prueba consistió en utilizar las 16 localidades, es decir tanto las localidades de superficie así como las de cuevas; en la segunda prueba solo se consideraron a las poblaciones de superficie; en la tercera se consideraron solo las poblaciones del norte que se encuentran por arriba del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano (CVTM), y la cuarta prueba consistió en probar la relación entre estas poblaciones norteñas con cada una de las poblaciones sureñas (Teapa, Tapijulapa y Río Tezendales).

6.4.5 Variación de microsatélites y medidas de diversidad genética

6.4.5.1 Estimación de alelos nulos, Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

En los microsatélites, los alelos nulos son aquellos fragmentos no amplificados en la PCR, debido a que las secuencias a las cuales se pegan los iniciadores presentan alguna mutación, lo que conduce a sobreestimar a los individuos homocigotos. La presencia de alelos nulos en una población puede ser identificada como un exceso de homocigotos, lo cual puede llevar a la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg

(EHW), esto por consiguiente puede inflar los niveles de diferenciación genética y afectar los análisis de genética de poblaciones que dependen de este equilibrio (Chapuis y Estoup, 2007; Carlsson, 2008). Debido a lo anteriormente mencionado, se estimó la frecuencia alelos nulos por locus y localidad a partir del índice de Brookfield 1 (Brookfield, 1996) en el programa MicroCheker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) y también con el uso del algoritmo de Maximización de la Expectativa (EM) de Dempster *et al.* (1977) en el programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007).

Posteriormente, se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento para garantizar la distribución independiente de los alelos en una sola población o en diferentes poblaciones. Este análisis se llevó a cabo por pares de loci con el uso del programa GENPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 2001), el cual se basa en el método de Cadenas de Markov, aplicando una prueba exacta de Fisher empleando 10,000 permutaciones con un criterio de significancia de 0.05.

Finalmente se determinó la existencia de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg, cuya hipótesis nula se basa en la existencia de panmixia, es decir, que todas las poblaciones son genéticamente homogéneas, dado que las constituyen individuos que se reproducen sexualmente y al azar, manteniéndose constantes las frecuencias alélicas y genotípicas generación tras generación. La estimación de este parámetro fue para cada locus y por población utilizando el programa GENPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 2001) mediante una prueba exacta de Fisher a partir del coeficiente de endogamia (F_{IS}) empleando el algoritmo de Cadenas de Markov con 10,000 demorizaciones, 5,000 batches y 1,000 iteraciones. Se efectuó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

6.4.5.2 Medidas de diversidad genética

Para la descripción de la variabilidad genética se hicieron estimaciones de los siguientes parámetros: número de alelos (N), número promedio de alelos por locus (N_a), número de alelos efectivos (N_e), la heterocigocidad observada (H_o), la heterocigocidad esperada no sesgada (H_e), y el índice de fijación (F), para lo cual se utilizó el programa Genetix 4.01 (Belkhir *et al.*, 1999).

Así mismo se realizó el cálculo de la diversidad genética de Nei (1987) con uso de la fórmula:

$$H_{sk} = \frac{n_k}{n_k - 1} (1 - \sum p_{ik}^2 - H_{ok}/2n_k)$$

Donde n_k es el tamaño de la muestra k , p_{ik} la frecuencia del alelo A_i en la muestra k y H_{ok} la proporción de heterocigocidad observada en la muestra k . Finalmente se calculó la riqueza alélica (R), la cual hace referencia al número de alelos independientemente del tamaño de la población, lo que permite comparar distintas poblaciones que tienen diferente tamaño de muestra, para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$R_s = \sum_{i=1}^{n_u} \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

Donde N_i es el número de alelos del tipo i entre los $2N$ genes. El término en la parte inferior de la sumatoria corresponde a la probabilidad de muestrear el alelo i al menos una vez en la muestra de tamaño $2n$. Tanto el valor de diversidad como el de riqueza alélica fueron calculados usando el paquete FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001).

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de individuos

7.1.1 Identificación morfológica de los individuos

Las poblaciones norteñas de Cuatrociénegas (CC), San Fernando (SF), Troncones (TR), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP) presentaron de 10-12 branquiespinas con un promedio de 11; de 10-14 radios en la aleta pectoral con un promedio de 12; de 19-23 de radios en la aleta anal con un promedio de 21 y de 32-37 escamas con un promedio de 35; mientras que las poblaciones sureñas de Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ) presentaron entre 11-14 espinas branquiales con un promedio de 13; 12 -14 radios en la aleta pectoral, con un promedio de 12; de 23-28 radios en la aleta anal con un promedio de 25 y de 33-38 escamas con un promedio de 35. Por su parte Catemaco mostró de 13 a 15 branquiespinas con un promedio de 14; de 14-15 radios en la aleta pectoral con un promedio de 14; de 22-28 radios en la aleta anal con un promedio de 25 y presentó de 33-38 escamas con un promedio de 36. Todos estos resultados se presentan en la Tabla I del Anexo III.

Se observó una clina de norte-sur en el número de radios anales así como el número de branquiespinas ya que las poblaciones norteñas (CC, SF, TR, LCA y SLP) mostraron menor número de radios anales y espinas branquiales, mientras que las sureñas (TA, TE, RTZ) mostraron mayor número en ambas características. La población de Catemaco presentó mayor cantidad de branquiespinas y valores parecidos en radios anales a las poblaciones sureñas, pero un mayor número de radios en la aleta pectoral.

De acuerdo a las características descritas arriba y a los criterios establecidos en Lozano-Vilano y Contreras-Balderas (1990), Paulo-Maya (1994) y Miller (2005) (Tabla III), los organismos de las localidades de Cuatrociénegas, San Fernando, Troncones, La Cañada y Huichihuayan se identificaron como *Astyanax mexicanus*, mientras que los individuos de las localidades de Teapa, Tapijulapa y Río Tzendales se identificaron como *Astyanax aeneus* (Tabla IV).

En cuanto a las características dentarias, los individuos de Catemaco presentaron en promedio 10 dientes maxilares (8 a 11) con 5 a 7 cúspides, el promedio de los dientes mandibulares fue de 7 (6 a 8) con 5 a 7 cúspides (generalmente 5) y solo 3 individuos mostraron de 7 a 9 cúspides. Los individuos identificados como *Astyanax* presentaron en promedio 7 dientes maxilares (6 a 8) con 3 a 5 cúspides (generalmente 5), el promedio de dientes mandibulares fue de 7 (6 a 8) con 3 a 7 cúspides (generalmente 5) (Tabla I del Anexo III; Figura 3A y 3B del Anexo IV). Dadas las características encontradas en los individuos de Catemaco, estos no pudieron diferenciarse de *Astyanax*, ya que las características con las que describen a *Bramocharax caballeroi* se encuentran dentro del rango de *Astyanax* (Tabla III).

Finalmente, no se contó con ejemplares de Garza Valdez, Arroyo Lagartos y El Zapotal, por lo que para estas localidades los análisis morfológicos no fueron realizados.

Tabla III. Características merísticas descriptivas de *Astyanax mexicanus* y *Astyanax aeneus* de acuerdo a los autores Lozano-Vilano y Contreras-Balderas (1990) y Paulo-Maya (1994). También se incluyen las características descritas para *Bramocharax Caballeroi* para el Lago Catemaco (Contreras-Balderas y Rivera-Teillery, 1976).

	Lozano-V. y Contreras-B.		Paulo-Maya		Contreras-B. y Rivera-T.
	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>B. caballeroi</i>
Radios pectorales	12 - 14	12 - 15	10 - 15	11 - 15	12 - 16
Radios anales	19 - 23	23 - 27	17 - 25	22 - 29	22 - 26
Branquiespinas	9 - 12	12 - 14	9 - 14	10 - 16	12 - 15
Línea lateral	35 - 38	34 - 36	29 - 38	30 - 39	31 - 37
Dientes Maxilares	0 - 7	0 - 7	---	---	0 - 19
Cúspides D. Maxilares	3 - 5	3 - 5	---	---	5
Dientes Mandíbula	4	4	---	---	5 - 6
Cúspides D. Mandíbula	5 - 7	5 - 7	---	---	7 - 9

Tabla IV. Identificación taxonómica de los individuos de acuerdo a Lozano-Vilano y Contreras-Balderas (1990) para las localidades analizadas, la cuenca hidrológica a la que pertenece y su respectivo acrónimo.

Cuenca	Acrónimo	Localidad	Especie
Bravo	CC	Cuatrociénegas	<i>Astyanax mexicanus</i>
San Fernando	SF	San Fernando	<i>Astyanax mexicanus</i>
Soto la Marina	TR	Troncones	<i>Astyanax mexicanus</i>
Pánuco	LCA	La Cañada	<i>Astyanax mexicanus</i>
Pánuco	SLP	Huichihuayan	<i>Astyanax mexicanus</i>
Grijalva-Usumacinta	TE	Teapa	<i>Astyanax aeneus</i>
Grijalva-Usumacinta	TA	Tapijulapa	<i>Astyanax aeneus</i>
Grijalva-Usumacinta	RTZ	Río Tzendales	<i>Astyanax aeneus</i>
Papaloapan	CAT	Catemaco	<i>Bramocharax caballeroi</i>

7.1.2 Identificación de individuos mediante distancias genéticas.

En la Tabla V se puede apreciar que los individuos identificados como *Astyanax mexicanus* para las localidades de Cuatrociénegas, San Fernando, Troncones, La Cañada y Huichihuayan presentaron una distancia genética promedio de 0.0931 (rango 0.058-0.123), la cual es un valor casi cuatro veces mayor al valor promedio de las distancias genéticas de los individuos identificados como *Astyanax aeneus* (promedio 0.0233, rango 0.019-0.029).

Por otro lado, los individuos considerados como *Bramocharax caballeroi* para la localidad de Catemaco muestran una distancia genética promedio con respecto a todas las localidades de 0.07 (rango 0.053-0.123), un valor más semejante al de *Astyanax mexicanus*.

Tabla V. Distancias de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) entre las distintas localidades de superficie identificadas morfológicamente. Para ver los acrónimos ir a la Tabla I.

	CC	SF	TR	LCA	SLP	TE	TA	RTZ
SF	0.104							
TR	0.123	0.071						
LCA	0.115	0.094	0.085					
SLP	0.117	0.091	0.073	0.058				
TE	0.087	0.087	0.076	0.046	0.053			
TA	0.098	0.091	0.085	0.057	0.067	0.022		
RTZ	0.105	0.096	0.087	0.053	0.069	0.019	0.029	
CAT	0.123	0.11	0.07	0.07	0.074	0.053	0.059	0.063

7.2 Determinación del número de poblaciones

Se obtuvo una base de datos de 469 individuos pertenecientes a 16 localidades en 7 cuencas hidrológicas dentro de la vertiente Atlántica Mexicana, genotipificadas con 10 loci microsatélites

7.2.1. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC)

En la Figura 5 se muestra un gráfico tridimensional, donde el total de la varianza explicada es del 46.85% compuesto por los factores 1(21.3%), 2 (14.13%) y 3(11.42%). Esta figura primeramente muestra 4 grupos principales, a la izquierda en círculo azul se sitúa la cueva de Pachón, dentro del círculo verde la cueva de Molino, debajo de este en morado se encuentran todas las poblaciones de superficie, y finalmente en la parte inferior se ubican las cuevas de Sabinos y Tinajas.

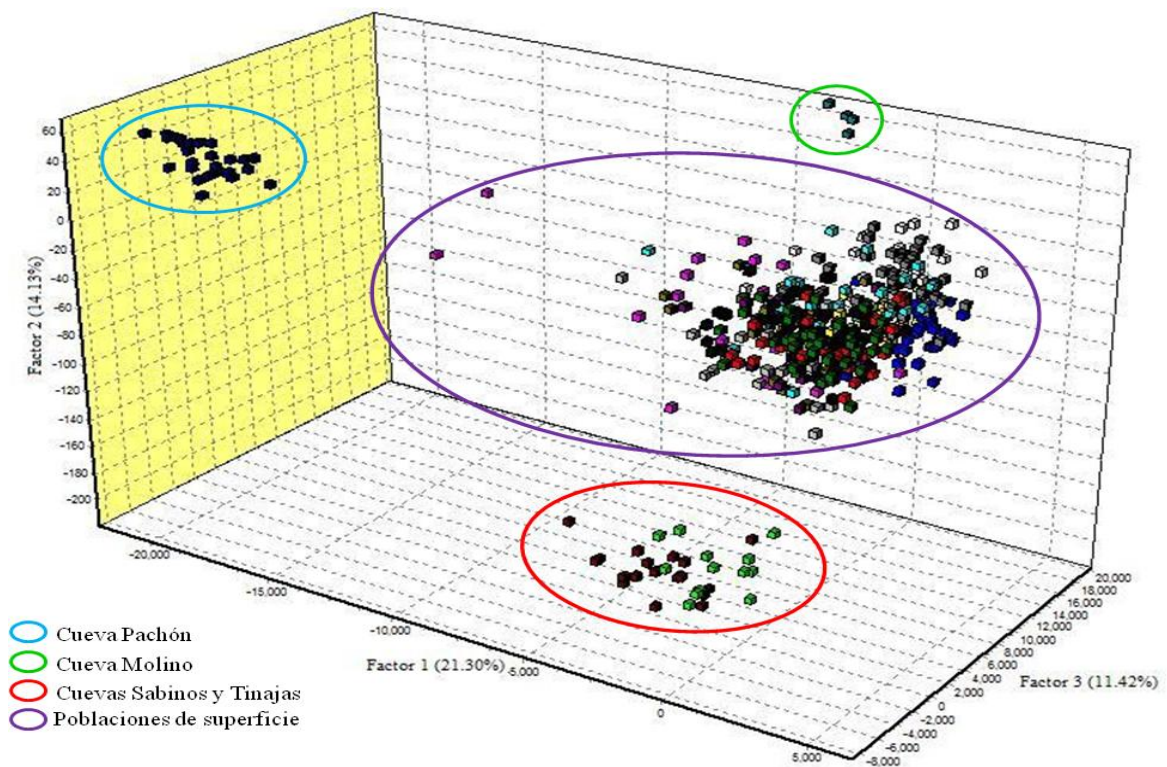


Figura 5. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) utilizando las frecuencias alélicas en las 16 localidades muestreadas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. Los individuos dentro del círculo azul corresponden a la cueva Pachón (PCH), dentro del verde ubicamos a la cueva Molino (ML), dentro del rojo están las cuevas de Sabinos (SAB) y Tinajas (TIN) y el círculo morado corresponde al resto de las poblaciones, las cuales son todas de superficie.

Como se puede apreciar en la Figura 5, las cuevas son entidades bien definidas y diferentes a las poblaciones de superficie, por lo que se prosiguió a realizar otro AFC que solo contuviera las poblaciones de superficie, obteniéndose así las Figuras 6 y 7, ambas figuras representan un solo análisis, pero bajo dos ángulos distintos de visualización que permitió definir mejor a las poblaciones.

En la Figura 6, bajo una visualización frontal se observan 4 grupos, a la izquierda (círculo azul) se observa un grupo conformado por las poblaciones de San Fernando (SF), Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), del lado derecho superior se encuentra bien separada la población de Cuatrociénegas (CC; círculo verde), en la parte inferior (círculo rojo) se encuentra también separada la población de El Zapotal (V) y finalmente en la parte media (círculo rosa) se encuentran el resto de las poblaciones.

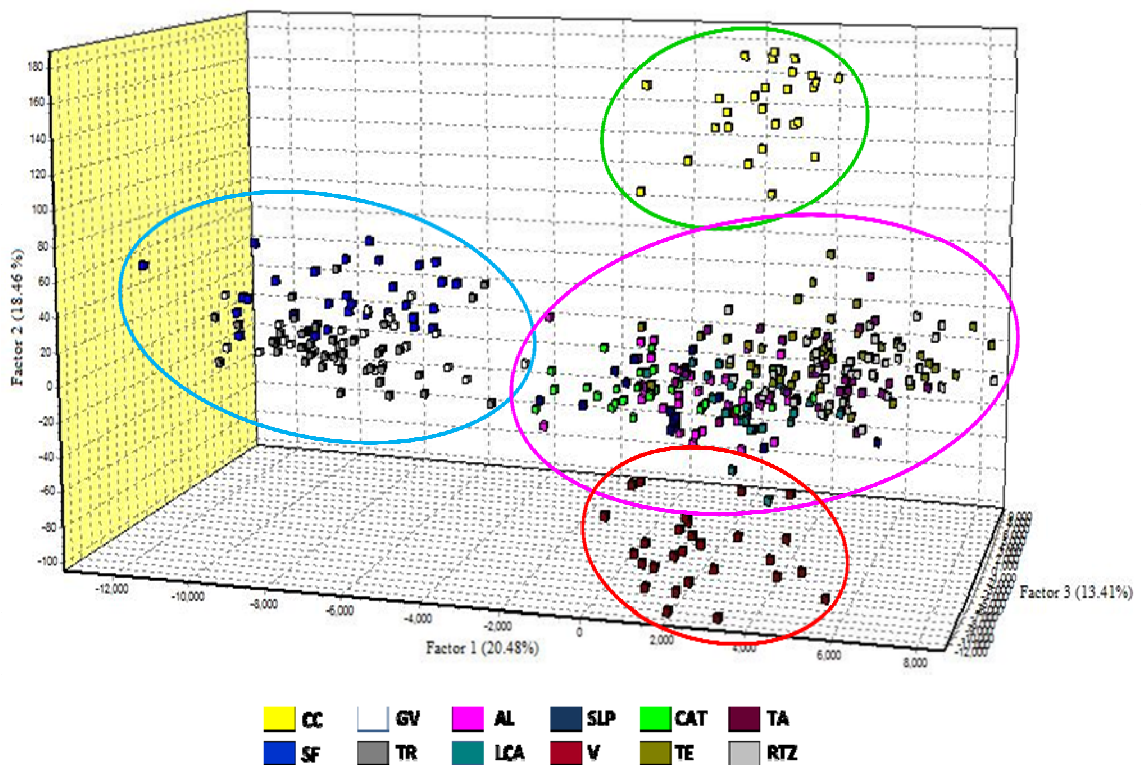


Figura 6. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) para 12 localidades de superficie muestreadas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana, visualización frontal. Los individuos dentro del círculo azul corresponden a las poblaciones de San Fernando (SF), Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), dentro del círculo verde ubicamos a Cuatrociénegas (CC), el círculo rojo corresponde a la población de El Zapotal (V) y dentro del círculo rosa están las poblaciones de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA), Huichihuayan (SLP), Catemaco (CAT), Teapa (TE), (Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ).

En la Figura 7, bajo una visualización superior podemos observar en la parte derecha la separación de la población de San Fernando (SF; círculo azul) de las localidades de Garza Valdez (GV) y Troncones (TR) (círculo gris), en la parte media se observa la separación de la población de Catemaco (círculo verde). Se puede observar también que las localidades de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP) (círculo rosa) forman un grupo y las localidades de Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ) forman otro (círculo morado), sin embargo estos se encuentran muy cercanos y ligeramente mezclados, finalmente en la parte inferior se encuentra bien separada la población de El Zapotal, lo cual ya se había observado en la Figura 6.

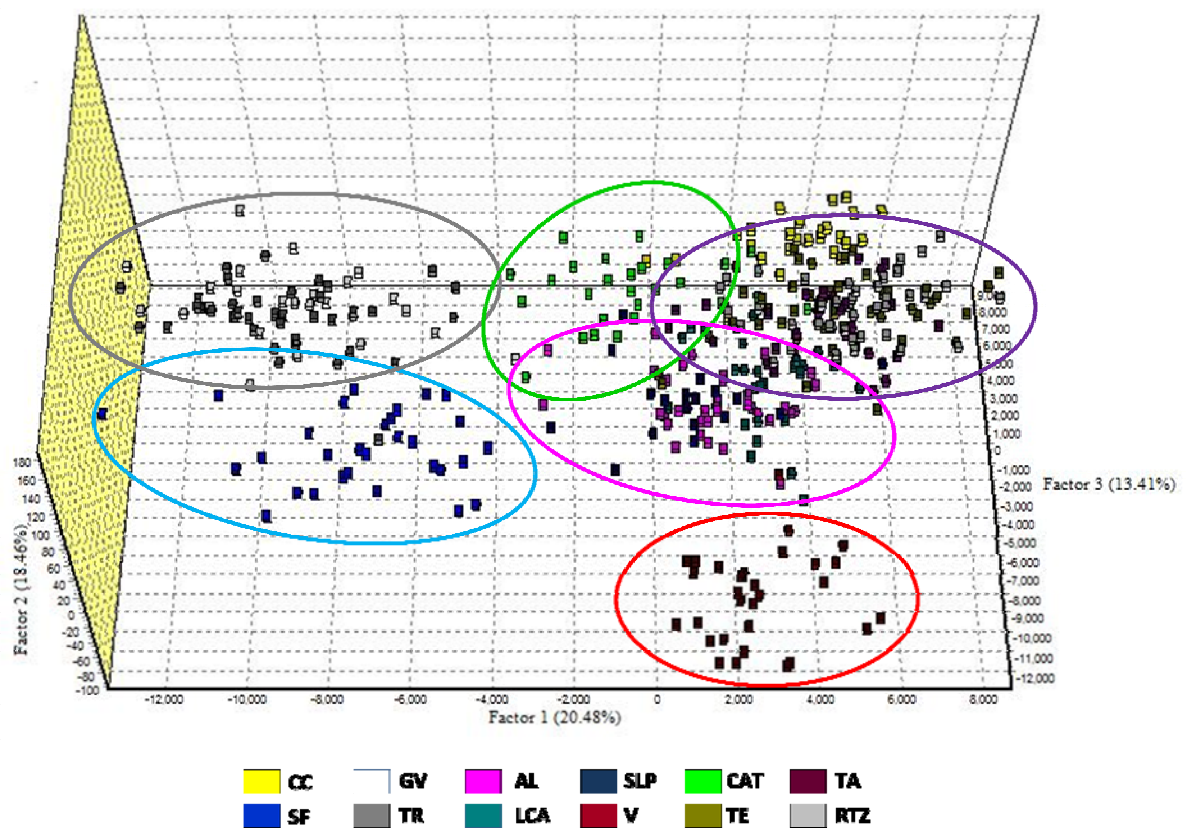


Figura 7. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) para 12 localidades de superficie muestreadas a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana, visualización superior. Los individuos dentro del círculo azul corresponden a la población de San Fernando, dentro del círculo gris están Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), dentro del círculo verde ubicamos a Catemaco, dentro del círculo rosa se ubican las poblaciones de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA), Huichihuayan (SLP), dentro del círculo morado se encuentran Teapa (TE), (Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ) y el círculo rojo corresponde a la población de El Zapotal (V).

Resumiendo, los resultados anteriores del AFC (Figuras 5, 6 y 7) identifican un total de 10 grupos que son los siguientes: 1) Cueva Molino (ML), 2) Cueva Pachón (PCH), 3) Cuevas de Sabinos (SAB) y Tinajas (TIN), 4) Cuatrociénegas (CC), 5) San Fernando (SF), 6) Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), 7) El Zapotal (V), 8) Catemaco (CAT), 9) Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP) y 10) Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ), aunque estos dos últimos se encuentran muy cercanos y ligeramente mezclados. Estas serían las potenciales poblaciones genéticamente homogéneas que habrá que caracterizar con las medidas de diversidad genética, esperando que se confirmen con los siguientes análisis.

7.2.3 Índices de Fijación de Wright (F_{ST})

Los resultados de la prueba de diferenciación genética mediante el cálculo de F_{ST} pareados por sitios de muestro, demostraron la existencia de diferencias genéticas elevadas, moderadas, pequeñas y en pocos casos no hubo. Como se puede observar en la Tabla VI, los valores en rojo muestran un elevado grado de diferenciación, los cuales corresponden a las comparaciones entre las cuevas de Molino, Pachón, Sabinos y Tinajas, sin embargo, la diferencia entre estas dos últimas fue moderada ($F_{ST} = 0.2682$, color naranja). Los valores en negritas representan valores moderados y significativos de diferenciación, que son la mayoría de las poblaciones. Por su parte los valores en azul, aunque muestran ser significativos, son valores pequeños, así podemos observar Arroyo Lagartos con La Cañada ($F_{ST} = 0.0530$) y Huichihuayan ($F_{ST} = 0.0476$); ligeramente más elevados con respecto a Teapa ($F_{ST} = 0.0689$), Tapijulapa ($F_{ST} = 0.0786$) y Río Tzendales ($F_{ST} = 0.0853$); Catemaco también muestra valores pequeños con respecto a Teapa ($F_{ST} = 0.0675$), Tapijulapa ($F_{ST} = 0.0675$) y Río Tzendales ($F_{ST} = 0.0833$) y valores más elevados con respecto a Garza Valdez ($F_{ST} = 0.0902$) y Troncones ($F_{ST} = 0.0957$). Finalmente los valores entre Garza Valdez y Troncones ($F_{ST} = 0.0119$), así como los de Teapa con respecto a Tapijulapa ($F_{ST} = 0.0095$) y Río Tzendales ($F_{ST} = 0.0095$) fueron muy bajos y no mostraron ser significativos (valores en verde).

Resumiendo los resultados anteriores se pueden identificar un total de 10 poblaciones genéticamente homogéneas, las cuales corresponden a lo encontrado anteriormente mediante el AFC.

Tabla VI. La parte diagonal superior muestra el número de migrantes eficaces (N_m), los valores en negrita son los que presentan más de un migrante. La parte diagonal inferior representa las comparaciones pareadas de los valores obtenidos de F_{ST} en la localidades muestreadas de *Astyanax mexicanus* a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. Todos los valores mostraron ser significativos, a excepción de los que se presentan en color verde, ya que estos no fueron significativos. Los números en rojo son considerados valores muy elevados de F_{ST} , los que están en negro son considerados como moderados, mientras que los que se encuentran en azul son pequeños, pero significativos. Para ver el significado de los acrónimos ver Tabla I.

	CC	SF	GV	TR	AL	ML	PCH	SAB	TIN	LCA	SLP	V	CAT	TE	TA	RTZ
CC		0.68	0.70	0.72	0.93	0.18	0.12	0.2	0.26	0.8	0.82	0.6	0.77	1.28	1.11	1.06
SF	0.2696		1.02	1.14	0.94	0.19	0.14	0.24	0.32	0.99	1.06	0.75	0.96	1.31	1.18	1.14
GV	0.2624	0.1971		20.81	1.51	0.32	0.19	0.3	0.4	1.26	1.78	1.09	2.52	1.66	1.72	1.41
TR	0.2587	0.1796	0.0119		1.61	0.36	0.23	0.36	0.45	1.38	1.88	1.15	2.36	1.61	1.6	1.37
AL	0.2112	0.2102	0.1421	0.1347		0.37	0.31	0.49	0.69	4.46	5.01	2.12	1.81	3.38	2.93	2.68
ML	0.5843	0.5655	0.4397	0.4068	0.4051		0.04	0.06	0.06	0.29	0.27	0.26	0.35	0.38	0.31	0.34
PCH	0.6704	0.6405	0.5707	0.5222	0.4478	0.8541		0.08	0.07	0.24	0.21	0.22	0.22	0.32	0.23	0.26
SAB	0.5509	0.5076	0.4518	0.4107	0.3401	0.8158	0.7665		0.68	0.37	0.39	0.38	0.37	0.46	0.4	0.42
TIN	0.4950	0.4356	0.3850	0.3551	0.2666	0.8041	0.7745	0.2682		0.55	0.6	0.55	0.51	0.59	0.53	0.56
LCA	0.2390	0.2009	0.1656	0.1532	0.0530	0.4663	0.5077	0.4026	0.3127		3.26	1.85	1.91	4.33	3.04	4.07
SLP	0.2340	0.1912	0.1232	0.1175	0.0476	0.4840	0.5422	0.3896	0.2955	0.0712		2.35	2.28	4.1	3.27	3.05
V	0.2957	0.2499	0.1869	0.1780	0.1053	0.4943	0.5273	0.3975	0.3132	0.1192	0.0962		1.55	1.97	2.04	1.75
CAT	0.2448	0.2074	0.0902	0.0957	0.1212	0.4180	0.5267	0.4038	0.3303	0.1158	0.0990	0.1389		3.46	3.45	2.75
TE	0.1636	0.1607	0.1310	0.1341	0.0689	0.3947	0.4411	0.3522	0.2968	0.0546	0.0574	0.1127	0.0675		26.06	26.05
TA	0.1839	0.1749	0.1269	0.1354	0.0786	0.4476	0.5202	0.3828	0.3198	0.0760	0.0711	0.1093	0.0675	0.0095		14.95
RTZ	0.1903	0.1799	0.1510	0.1540	0.0853	0.4265	0.4887	0.3731	0.3103	0.0579	0.0758	0.1250	0.0833	0.0095	0.0165	

7.2.3 Flujo genético

El número de migrantes (Nm) por pares de poblaciones se muestra en la parte diagonal superior de la Tabla VI. Las poblaciones que mostraron valores de 1 o más migrantes efectivos fueron: Garza Valdez (GV) con San Fernando (SF), Troncones con San Fernando y Garza Valdez, Arroyo Lagartos (AL) con Garza Valdez y Troncones, La Cañada (LCA) con Garza Valdez, Troncones y Arroyo Lagartos, Huichihuayan (SLP) con San Fernando, Garza Valdez, Troncones y Arroyo Lagartos y la Cañada, El Zapotal (V) con Garza Valdez, Troncones, Arroyo Lagartos, La Cañada y Huichihuayan, Catemaco (CAT) con Garza Valdez, Troncones, Arroyo Lagartos, La Cañada, Huichihuayan y El Zapotal, Teapa (TE) con todas las poblaciones de superficie, al igual que Tapijulapa y Río Tzendales.

7.2.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la varianza genética en cada uno de los modelos probados se encuentra repartida entre los individuos con valores entre 71.81 y 73.45% de la varianza total y valores de F_{ST} significativos ($P < 0.00$; Tabla VII), lo que indica una alta variación genética entre los individuos.

Tabla VII. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de estructura genética poblacional multilocus de *Astyanax mexicanus* a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana. Los valores en negrita indican que el valor estadístico de F es significativamente diferente de cero, $P < 0.05$

Estrutura probada	Fuente de Variación	Varianza	% del total	Estadístico F	Valor P
A. Todas Poblaciones Distintas (1 grupo)	Entre grupos	1.16376	26.55		
	Dentro de las poblaciones	3.21974	73.45	$F_{ST} = 0.2654$	0.00
B. Grupos Filogenéticos (5 grupos)	Entre grupos	0.29026	6.47	$F_{CT} = 0.0647$	0.1339
	Dentro de los grupos	0.97395	21.72	$F_{SC} = 0.2322$	0.00
	Dentro de las poblaciones	3.21974	71.81	$F_{ST} = 0.2819$	0.00
C. Cuencas Hidrológicas (6 grupos)	Entre grupos	0.12916	2.93	$F_{CT} = 0.0293$	0.30
	Dentro de los grupos	1.05758	24.00	$F_{SC} = 0.2472$	0.00
	Dentro de las poblaciones	3.21974	73.07	$F_{ST} = 0.2693$	0.00
D. Valores de F_{ST} (10 grupos)	Entre grupos	1.09414	24.49	$F_{CT} = 0.2449$	0.00
	Dentro de los grupos	0.15367	3.44	$F_{SC} = 0.0455$	0.00
	Dentro de las poblaciones	3.21974	72.02	$F_{ST} = 0.2793$	0.00

De acuerdo a los resultados obtenidos con el AMOVA para los distintos modelos probados, el Modelo D fue el que presentó los valores más altos de varianza explicada entre grupos y F_{ST} , y los valores más bajos de varianza dentro de los grupos (Tabla VII). Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos con el AFC y los F_{ST} pareados.

7.2.5 Empleo de probabilidades bayesianas

La prueba de asignación de individuos a partir del método bayesiano mediante el uso del programa STRUCTURE detectó una estructura poblacional para los individuos de *Astyanax mexicanus*. En la Figura 8A se observan los valores promedio de la probabilidad $\text{LnP}(D)$ para cada K inferida en las localidades, en este caso la mayor probabilidad se obtuvo para una $K=10$. El método de Evanno *et al.* (2005) expresado gráficamente por la Figura 8B muestra también 10 grupos o poblaciones, primeramente se observa una ΔK máxima de 3, que estaría representando a las poblaciones de las cuevas, y posteriormente un subgrupo de 7 poblaciones, que representan las poblaciones de superficie, de ahí que observemos dos picos en la gráfica.

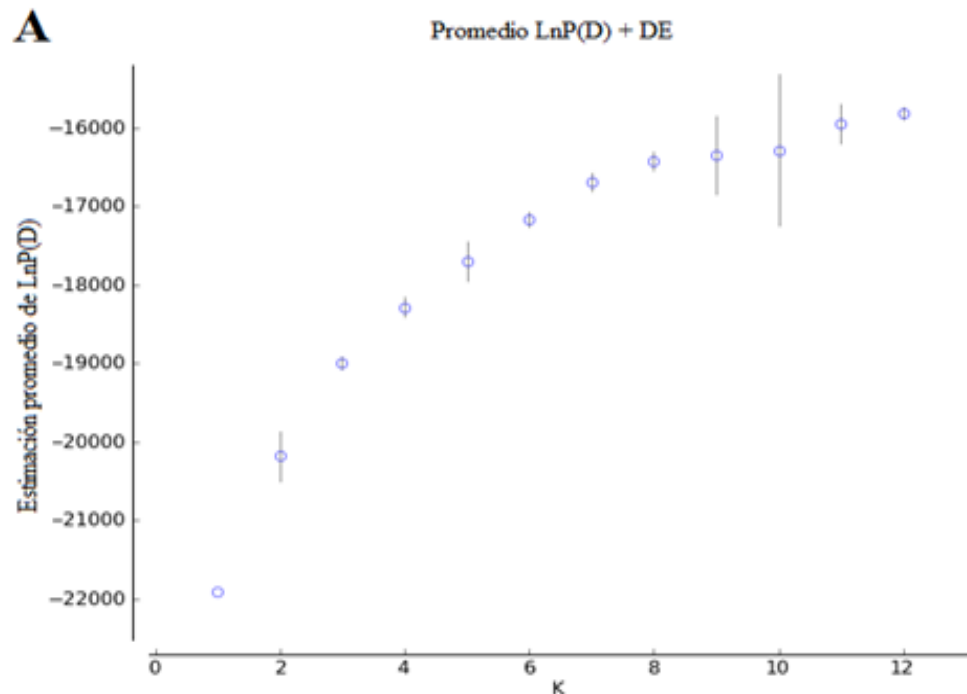


Figura 8. A) Representa el número de poblaciones inferidas (K) de *Astyanax mexicanus* a partir del cálculo de $\text{LnP}(D)$ promedio de 10 repeticiones con el uso de programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000).

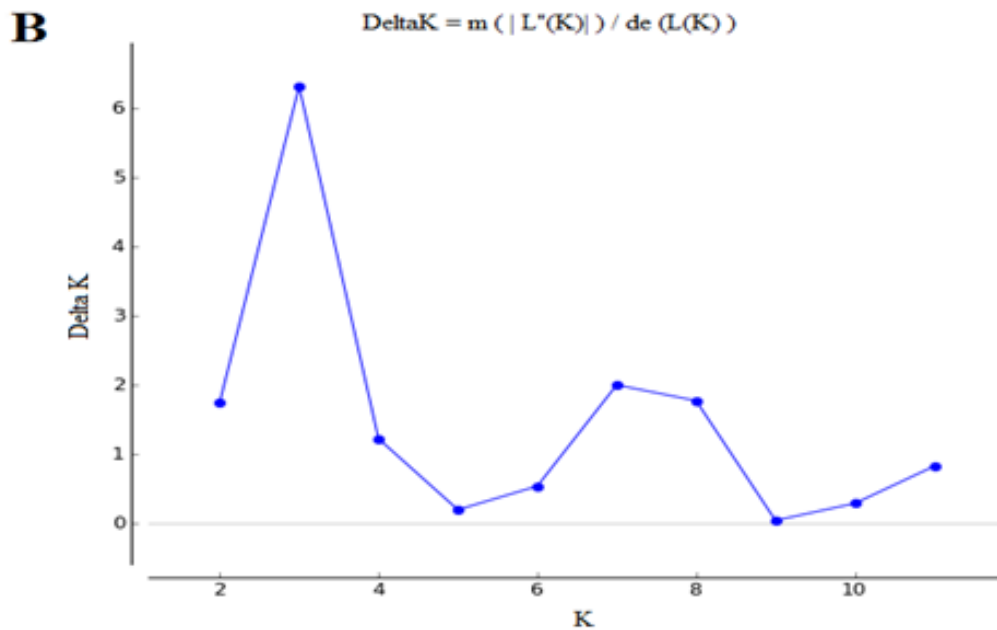


Figura 8. B) Número de grupos genéticamente homogéneos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud o ΔK (Evanno *et al.*, 2005)

En la Figura 9 se pueden observar estos 10 grupos homogéneos formados por STRUCTURE, de izquierda a derecha están la población de Cuatrociénegas (CC) representa un conjunto de datos muy homogéneo (95% de probabilidad de asignación de individuos), seguida de San Fernando (SF, 85%) que también presenta conjunto homogéneo, posteriormente las poblaciones de Garza Valdez (GV) y Troncones (TR) conforman otro grupo homogéneo (92%), en rojo esta el grupo conformado por las poblaciones de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP), los cuales forman otro grupo homogéneo pero con un probabilidad de asignamiento 70%, por su parte la cueva Molino (ML) representa un conjunto altamente homogéneo (99%), al igual que la cueva de Pachón (PCH, 99%), y las cuevas de Sabinos y Tinajas forman otro grupo homogéneo (97%), la población de El Zapotal representa otro grupo muy homogéneo (91%), al igual que Catemaco (86%) y finalmente las localidades de Teapa (TE) Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ) conformaron otro grupo homogéneo (84%).

Cabe señalar que las poblaciones del sur, como lo son La Cañada, Huichihuayan, Teapa, Tapijulapa, y Río Tzendales tienden a tener cierta mezcla, lo cual

también se pudo apreciar en el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), los índices de F_{ST} y el AMOVA. Además también se puede apreciar que Catemaco (color rosa) comparte genotipos con las poblaciones de Garza Valdez y Troncones (color azul claro).

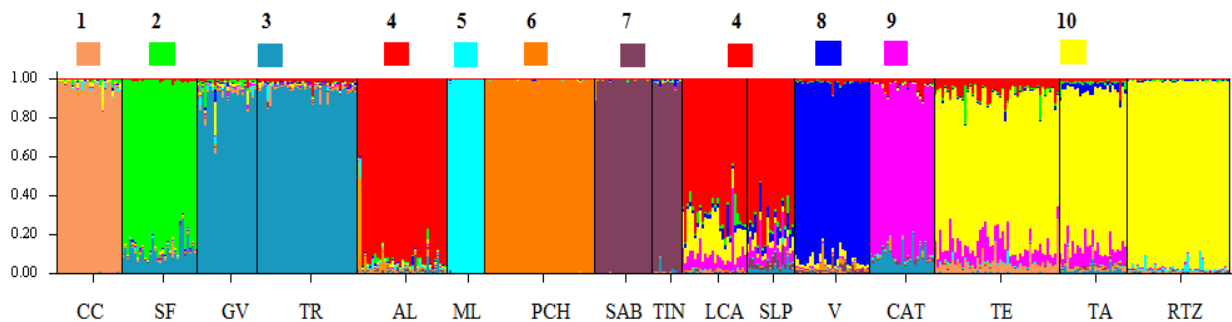


Figura 9. Número de poblaciones determinado por el programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Cada una de las líneas verticales representa el genotipo multilocus determinado por las frecuencias alélicas para cada individuo. El color café claro caracteriza a Cuatrociénegas (CC), el verde a San Fernando (SF), el azul claro representa a Garza Valdez (GV) y Troncones (TR), el rojo es característico de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP), el color celeste es distintivo de cueva Molino (ML), el naranja describe a la cueva de Pachón (PCH), el púrpura representa a las cuevas de Sabinos (SAB) y Tinajas (TIN), El Zapotal (V) está representado por el color azul, el color rosa es representativo de Catemaco (CAT) y el amarillo es distintivo de las poblaciones de Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales.

7.3 Reconstrucción del dendrograma

El dendrograma obtenido mediante el algoritmo del vecino más cercano (NJ), se muestra en la Figura 10, en la cual se observan tres ramas principales, la primera rama (parte izquierda) incluye a las poblaciones de cuevas: Sabinos, Tinajas, Pachón y Molino (en color rojo); la segunda rama (color azul) contiene a las poblaciones que geográficamente son más norteñas que incluyen a Cuatrociénegas, San Fernando, Trocones y Garza Valdez, y la última rama (parte inferior) contiene a las poblaciones ubicadas geográficamente en la parte media (color verde) y sur del país (color rosa), las cuales son, Arroyo Lagartos, Huichihuayan, La Cañada, El Zapotal, Catemaco, Teapa, Tapijulapa y Río Tzendales.

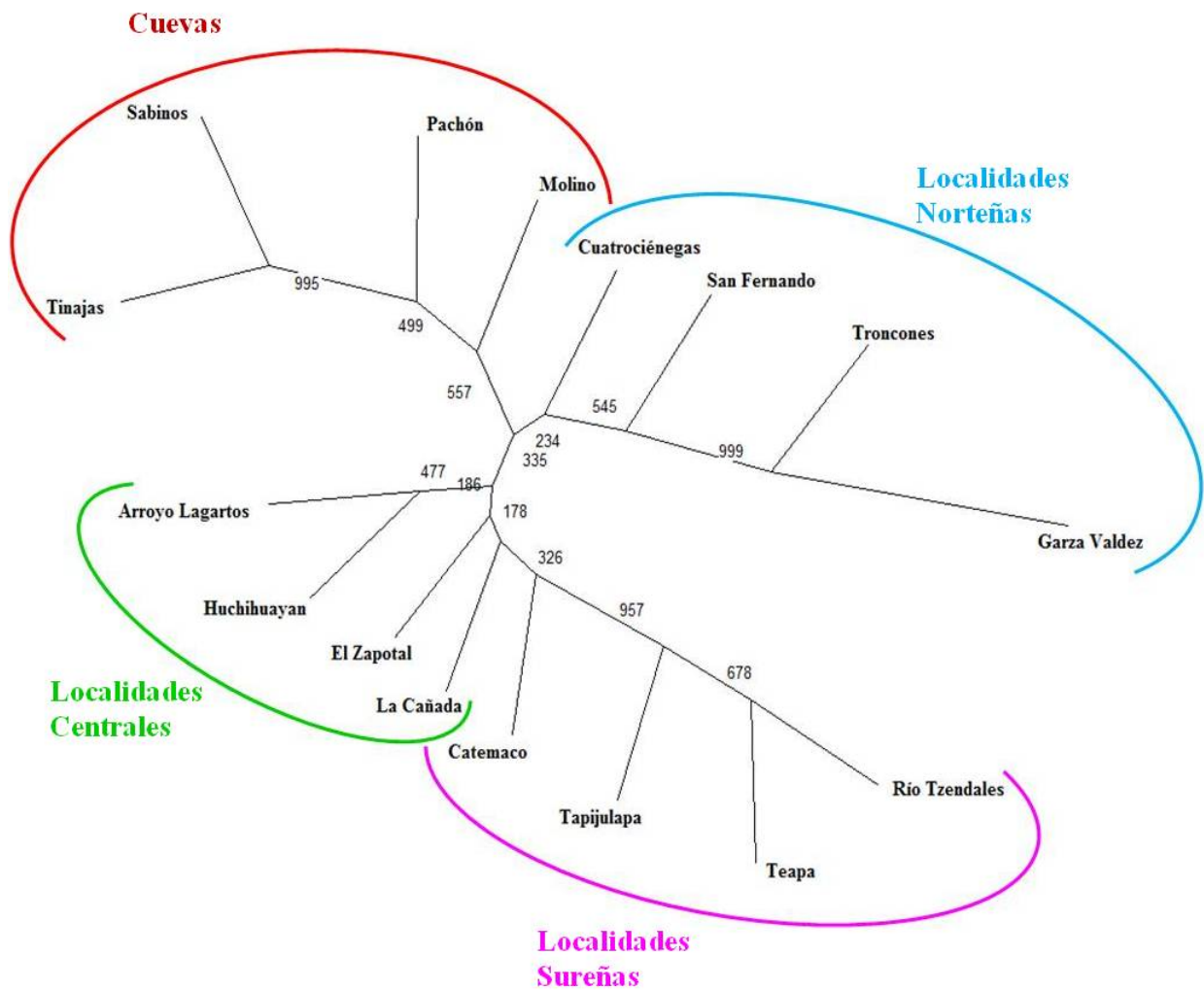


Figura 10. Dendrograma reconstruido mediante el método del vecino más cercano (NJ) no enraizado, basado en distancias D_{CE} (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) por pares de localidades usando 10 loci microsatélites. El soporte de las ramas se realizó mediante Bootstrapping con 10,000 permutaciones.

Al igual que los análisis anteriores (AFC, F_{ST} , AMOVA y STRUCTURE), se puede observar que las cuevas de Sabinos y Tinajas forman un conjunto bien soportado (99.5%) dentro del grupo de cuevas, igualmente las localidades de Troncones y Garza Valdez forman otra rama bien soportada (99.9%) y también las localidades más sureñas que corresponden a las poblaciones de Teapa, Tapijulapa y Río Tzendaes forman otra rama fuertemente soportada (95.7%). Finalmente la localidad de Arroyo Lagartos junto con Huichihuayan forman una rama medianamente soportada (47.7%), y a diferencia de los análisis anteriores la localidad de La Cañada se encuentra en una rama posterior, la

cual esta débilmente soportada (17.8%), sin embargo de manera general, se observa el mismo patrón de agrupamiento que los resultados obtenidos con los análisis anteriores.

7.4 Aislamiento por Distancia

La prueba de Mantel para las 16 localidades mostró que no existe una correlación estadísticamente significativa entre las distancias genéticas y la distancias geográficas al obtenerse un valor de $R^2 = 0.0787$ y $P = 0.908$ (Figura 11).

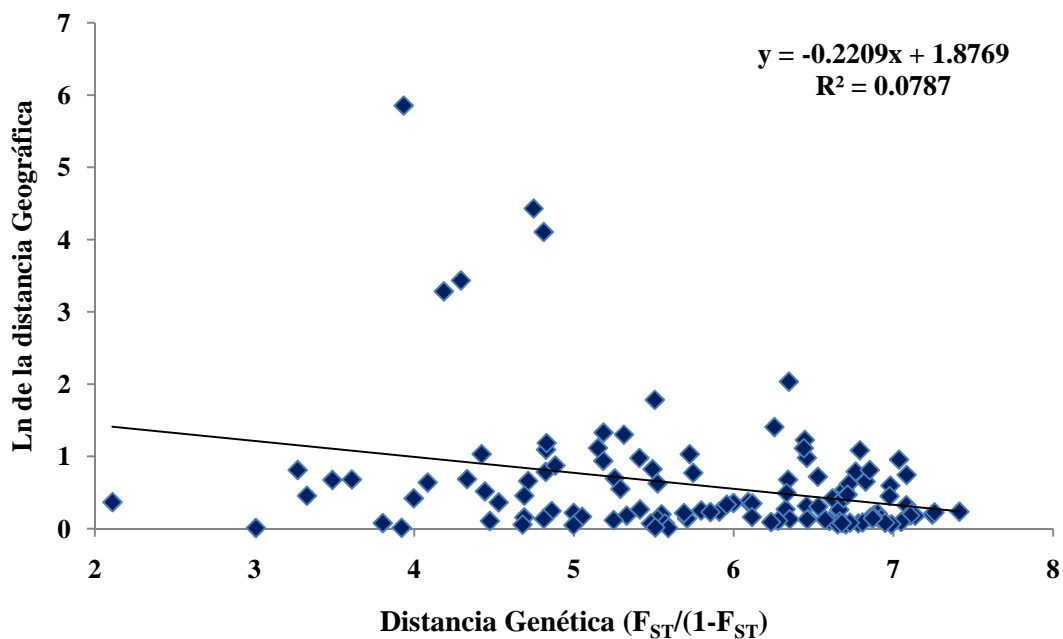


Figura 11. Gráfica que muestra el logaritmo natural de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para las 16 localidades muestreadas. La función en el gráfico indica la ecuación de regresión lineal obtenida de los datos.

Se realizó una segunda prueba de Mantel utilizando solo las 12 localidades de superficie, la cual tampoco mostró una correlación estadísticamente significativa entre las distancias genéticas y la distancias geográficas ($R^2 = 0.067$ y $P = 0.125$; Figura 12).

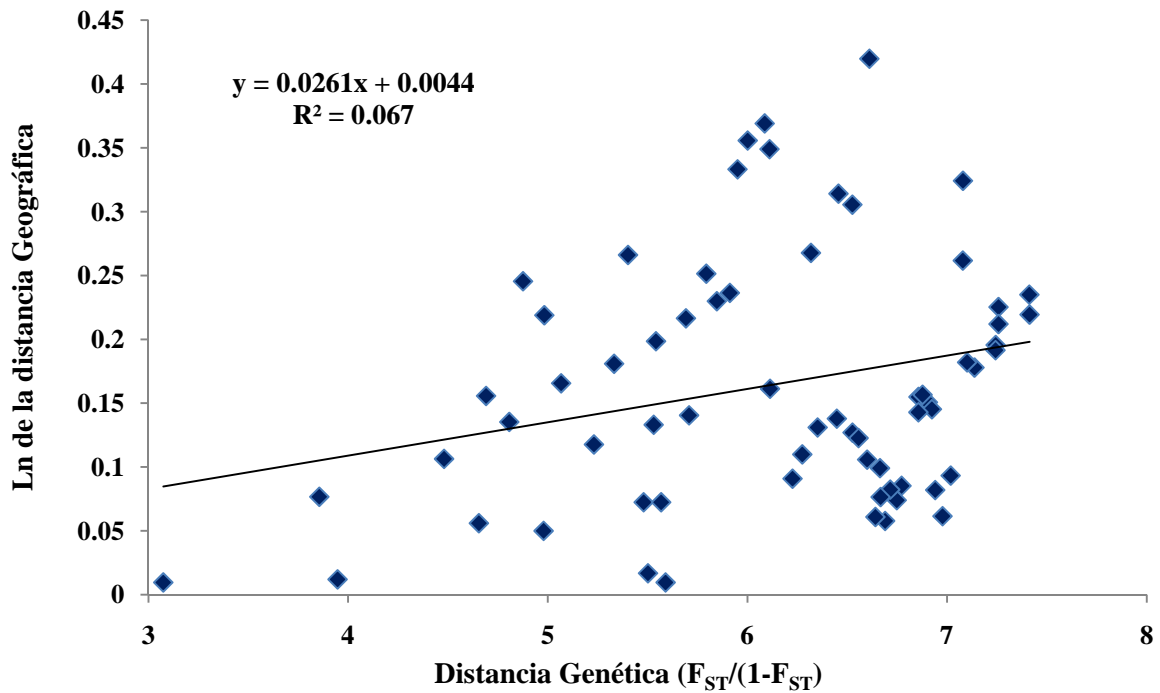


Figura 12. Gráfica que muestra el logaritmo natural de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para las 12 localidades de superficie. La función en el gráfico, indica la ecuación de regresión lineal obtenida de los datos.

En una tercera prueba de Mantel, pero ahora utilizando solo las localidades que se encuentran por arriba del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano (Cuatrociénegas, San Fernando, Garza Valdez, Troncones, Arroyo Lagartos, La Cañada, Huichihuayan y El Zapotal), si se observó una correlación estadísticamente significativa entre las distancias genéticas y la distancias geográficas ($R^2 = 0.696$ y $P = 0.0$; Figura 13).

La última prueba de Mantel utilizando solo las localidades que se encuentran por arriba del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano (Cuatrociénegas, San Fernando, Garza Valdez, Troncones, Arroyo Lagartos, La Cañada, Huichihuayan y El Zapotal) contra las localidades sureñas (Teapa, Tapijula y Río Tzendales), mostró también una correlación estadísticamente significativa entre las distancias genéticas y la distancias geográficas ($R^2 = 0.633$ y $P = 0.0$; Figura 14).

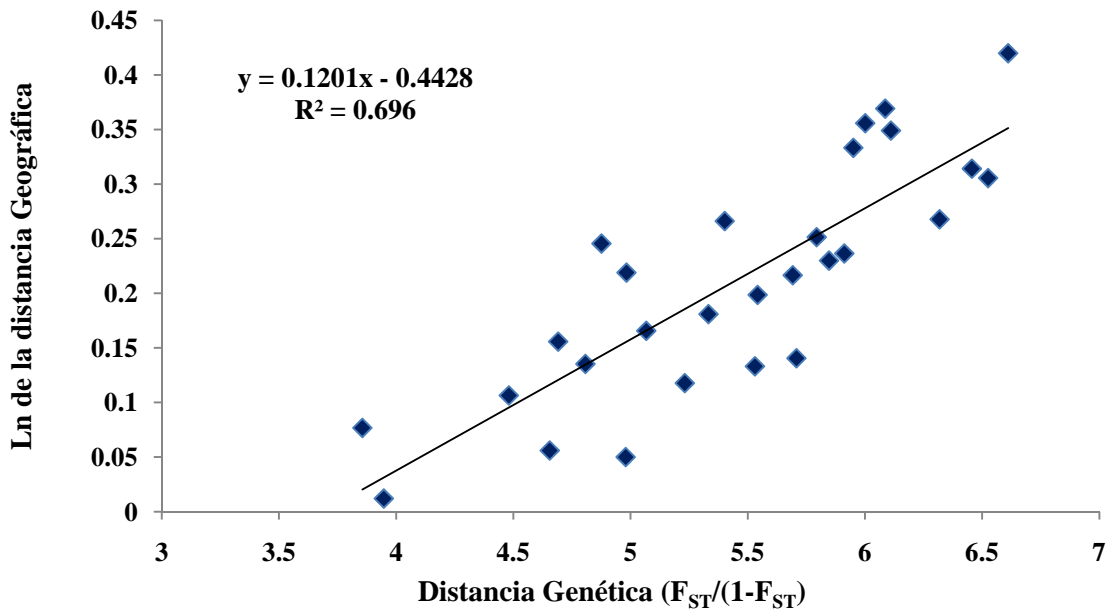


Figura 13. Gráfica que muestra el logaritmo natural de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para las localidades norteñas que se encuentran por encima del Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM). La función en el gráfico, indica la ecuación de regresión lineal obtenida de los datos.

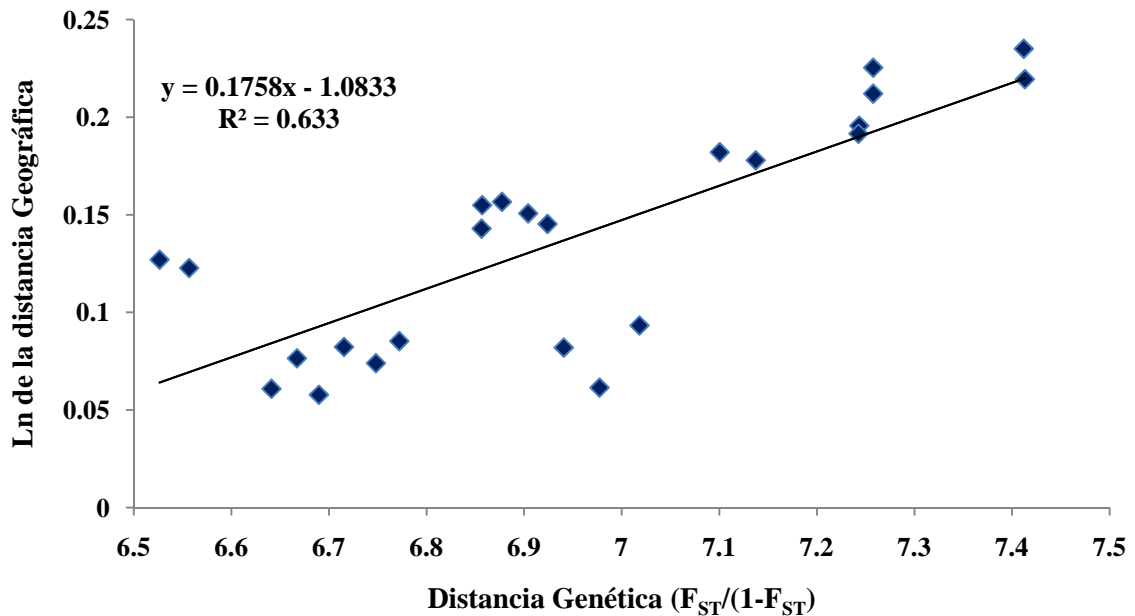


Figura 14. Gráfica que muestra el Ln de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada por pares de los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) para las localidades norteñas que se encuentran por encima del Cinturón Volcánico Transmexicano contra las localidades Sureñas. La función en el gráfico, indica una ecuación de regresión lineal obtenida de los datos.

7.5 Variación de microsatélites y medidas de diversidad genética

7.5.1 Estimación de alelos nulos, desequilibrio de ligamiento y Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los análisis se realizaron con poblaciones genéticamente homogéneas establecidas en la previa sección. La estimación de frecuencia de alelos nulos con los programas de MicroChecker y FreeNA se muestra en la Tabla VIII. Solo 7 de las 100 pruebas en MicroCheker mostraron significancia: la población de San Fernando para el locus Wf6, Garza Valdez/Troncones para el locus Xa3, Arroyo Lagartos/La Cañada/Huichihuayan en los loci Vf9 y VF3, Sabinos/Tinajas en el locus Ast02 y Catemaco en los loci Ast10 y VF3. Sin embargo estas frecuencias fueron bajas, por lo que fueron ignoradas.

Tabla VIII. Frecuencia de alelos nulos por locus y población. Estimación según el estimador de Brookfield 1 y el algoritmo EM con los programas de MicroChecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) y FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007). Se muestra el valor de *P* para el estimador de Brookfield 1, siendo significativos los marcados con *. Para el significado de acrónimos ver Tabla 1.

Localidad	Estimador	Ast09	Ast10	Ast02	Vc10	A14d12	Wf6	Xa3	Vf9	Lb9	VF3
CC	Brookfield 1	-----	-----	-----	-----	0.1131	-----	-----	-----	-----	-----
	<i>P</i>					>0.05					
SF	EM	0.0393	0.0000	0.0842	0.0415	0.0841	0.0149	0.0678	0.0390	0.0000	0.0000
	Brookfield 1	-----	-----	-----	-----	-----	0.0811	-----	-----	-----	-----
GV-TR	<i>P</i>						<0.05*				
	EM	0.000	0.0418	0.0000	0.0000	0.0117	0.1096	0.0793	0.0334	0.0000	0.0000
AL-LCA	Brookfield 1	0.1048	-----	0.0412	-----	0.0760	-----	0.0880	0.0823	-----	-----
	<i>P</i>	>0.05		>0.05		>0.05		<0.001*	>0.05		
SLP	EM	0.0747	0.0068	0.0387	0.0177	0.0727	0.0152	0.1178	0.0524	0.0000	0.0167
	Brookfield 1	-----	0.0776	0.0441	0.0513	-----	-----	-----	-----	0.0728	0.0601
ML	<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05					<0.05*	<0.01*
	EM	0.0278	0.0742	0.1602	0.0731	0.0489	0.0164	0.0040	0.0341	0.0726	0.0925
PCH	Brookfield 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	<i>P</i>										
SAB-TIN	EM	0.0010	0.0010	0.0000	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0008	0.0010	0.0010
	Brookfield 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V	<i>P</i>			0.1366							
	EM	0.0010	0.1772	0.1780	0.0010	0.1674	0.0010	0.1347	0.1491	0.0000	0.1148
CAT	Brookfield 1	-----	-----	0.0875	-----	0.1017	-----	-----	-----	-----	-----
	<i>P</i>			>0.05		>0.05					
TE-TA	EM	0.0000	0.0555	0.1195	0.0673	0.0803	0.0032	0.0353	0.0000	0.0528	0.0000
	Brookfield 1	-----	0.1138	-----	-----	-----	-----	-----	0.0696	-----	0.1443
RTZ	<i>P</i>		<0.001*						>0.05		<0.001*
	EM	0.0000	0.1584	0.0000	0.0000	0.0264	0.0008	0.0521	0.0607	0.0000	0.1651
RTZ	Brookfield 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.0702	-----	0.0464	-----
	<i>P</i>							>0.05		>0.05	
	EM	0.0020	0.0000	0.0196	0.0295	0.0202	0.0185	0.0853	0.0394	0.0676	0.0130

----- Incidencia de alelos nulos no detectada

En lo que respecta a la prueba de desequilibrio de ligamiento por pares de locus, estos no mostraron valores significativos (Tabla IX), es decir que los loci empleados en este trabajo se segregan de manera independiente, y por lo tanto no es una agente causante del desajuste al EHW.

Tabla IX. Comparación del desequilibrio de ligamiento por pares de locus en *Astyanax mexicanus* arrojados por el programa GENPOP (Raymond y Rousset, 2001).

Par de locus		Valor P	Par de locus		Valor P
Ast09	& Ast10	0.3817	Ast02	& V-f9	0.3035
Ast09	& Ast02	0.8876	V-c10	& V-f9	0.5743
Ast10	& Ast02	0.2831	A14-d12	& V-f9	0.2513
Ast09	& V-c10	0.3245	W-f6	& V-f9	0.0931
Ast10	& V-c10	0.3348	X-a3	& V-f9	0.1174
Ast02	& V-c10	0.9100	Ast09	& L-b9	0.4740
Ast09	& A14-d12	0.9855	Ast10	& L-b9	0.0522
Ast10	& A14-d12	0.5526	Ast02	& L-b9	0.2603
Ast02	& A14-d12	0.9810	V-c10	& L-b9	0.0199
V-c10	& A14-d12	0.4076	A14-d12	& L-b9	0.6938
Ast09	& W-f6	0.4233	W-f6	& L-b9	0.1448
Ast10	& W-f6	0.1424	X-a3	& L-b9	0.4369
Ast02	& W-f6	0.9996	V-f9	& L-b9	0.0650
V-c10	& W-f6	0.5551	Ast09	& VF3	0.0878
A14-d12	& W-f6	0.3098	Ast10	& VF3	0.9296
Ast09	& X-a3	0.1039	Ast02	& VF3	0.9579
Ast10	& X-a3	0.0639	V-c10	& VF3	0.6451
Ast02	& X-a3	0.9994	A14-d12	& VF3	0.4691
V-c10	& X-a3	0.2417	W-f6	& VF3	0.9490
A14-d12	& X-a3	0.8618	X-a3	& VF3	0.3298
W-f6	& X-a3	0.6615	V-f9	& VF3	0.7076
Ast09	& V-f9	0.9477	L-b9	& VF3	0.5528
Ast10	& V-f9	0.0256			

Los análisis sobre el EHW mostraron que casi todas poblaciones analizadas estuvieron en equilibrio para la mayoría de los loci, sin embargo las que mostraron una desviación al EHW aún después de la corrección de Bonferroni fueron: la población de Garza Valdez/Troncones en el locus Xa3, Arroyo Lagartos/La Cañada/Huichihuayan en el locus Ast02, Sabinos/Tinajas en el locus Ast02 y finalmente Catemaco en los locus Ast10 y VF3, estas desviaciones fueron ocasionadas por un exceso de heterocigotos, no obstante, las pruebas de desviación al EHW multilocus por población mostraron estar en equilibrio (Tabla X).

7.5.2 Medidas de diversidad genética

La Tabla X presenta los valores descriptivos de la variabilidad genética en las distintas poblaciones de superficie y de cuevas para cada locus. El número de alelos por locus (N_a) varió de 1 a 23 con un promedio de 8.3, el número de alelos efectivos (N_e) varió de 1 a 11.8 con un promedio de 4, la riqueza alélica (R) varió de 1 a 13.9 con un promedio de 5.8, la heterocigocidad observada (H_o) registro valores entre 0 y 0.923 con un promedio de 0.485, la heterocigocidad esperada no sesgada (H_e) se encontró entre 0 y 0.921 con un promedio de 0.556 y los valores del índice de fijación (F) variaron entre -0.292 y 0.665 con un promedio de 0.145. En la Figura 15 se puede apreciar como las poblaciones de cuevas [Molino (ML), Pachón (PCH), Sabinos/Tinajas SAB-TIN)], presentaron los valores promedio más bajos de variabilidad genética y los más altos para el índice de fijación, mientras que las poblaciones de superficie mostraron valores altos en cuanto a variabilidad genética y los valores de índice de fijación fueron más bajos.

Tabla X. Variabilidad genética estimada mediante 10 loci microsatélite de *Astyanax mexicanus* en las localidades muestreadas. Se muestra el tamaño de muestra (N), número de alelos (N_a), alelos efectivos (N_e), riqueza alélica (R), heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e) y el índice de fijación (F). * En desequilibrio de Hardy-Weinberg después del ajuste Bonferroni con $P < 0.001$. Para el significado de los acrónimos ver Tabla I.

Localidad	Estimador	Ast09	Ast10	Ast02	Vc10	A14d12	Wf6	Xa3	Vf9	Lb9	VF3	Promedio
CC	N	26	26	26	25	25	26	26	26	26	26	25.8
	N_a	6	4	4	9	8	3	5	7	3	7	5.6
	N_e	2.042	1.219	2.508	3.521	3.125	1.985	2.537	4.433	1.431	3.159	2.596
	R	4.579	2.767	3.664	6.277	5.587	2.423	4.387	6.035	2.844	4.926	4.348
	H_o	0.462	0.192	0.500	0.680	0.520	0.462	0.500	0.692	0.346	0.654	0.500
	H_e	0.520	0.183	0.613	0.731	0.694	0.506	0.618	0.790	0.307	0.697	0.565
	F	0.096	-0.070	0.169	0.050	0.235	0.070	0.175	0.106	-0.150	0.043	0.072
SF	N	30	30	30	30	30	29	30	30	30	30	29.9
	N_a	4	6	7	7	13	11	5	7	6	7	7.3
	N_e	1.619	1.579	1.278	2.791	6.569	4.485	2.120	3.333	3.136	4.444	3.135
	R	3.199	3.684	3.436	4.611	9.293	8.013	4.112	5.164	4.099	6.073	5.168
	H_o	0.400	0.267	0.200	0.767	0.833	0.586	0.400	0.633	0.700	0.800	0.558
	H_e	0.389	0.373	0.221	0.653	0.862	0.791	0.537	0.712	0.693	0.788	0.601
	F	-0.047	0.273	0.079	-0.195	0.017	0.246	0.243	0.095	-0.028	-0.032	0.065
GV-TR	N	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
	N_a	9	10	23	13	11	16	10	9	6	19	12.6
	N_e	2.256	3.664	11.237	4.171	5.007	8.623	5.282	3.114	1.571	6.059	5.098
	R	4.581	6.905	13.923	8.262	7.564	10.966	7.734	5.967	2.937	11.091	7.993
	H_o	0.469	0.750	0.813	0.672	0.672	0.891	0.594	0.547	0.359	0.750	0.652
	H_e	0.561	0.733	0.918	0.766	0.807	0.891	0.817*	0.684	0.366	0.842	0.738
	F	0.158	-0.032	0.108	0.116	0.160	-0.007	0.268	0.194	0.011	0.102	0.108

Continuación Tabla X.

Localidad	Estimador	Ast09	Ast10	Ast02	Vc10	A14d12	Wf6	Xa3	Vf9	Lb9	VF3	Promedio
AL-LCA-SLP	N	81	81	81	81	81	81	81	81	81	79	80.6
	Na	10	12	19	18	20	16	12	11	13	15	14.6
	Ne	2.319	3.775	11.800	8.673	7.051	7.720	7.155	8.148	4.420	6.722	6.778
	R	5.712	8.557	12.957	11.218	11.855	9.818	8.955	9.137	8.627	9.209	9.604
	Ho	0.481	0.617	0.605	0.741	0.788	0.825	0.889	0.800	0.679	0.671	0.709
	He	0.572	0.740	0.921*	0.890	0.864	0.876	0.866	0.883	0.779	0.857	0.825
	F	0.154	0.160	0.339	0.163	0.094	0.052	-0.033	0.088	0.122	0.212	0.135
ML	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Na	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1.3
	Ne	1	1	1.069	1	1	1	1	1.744	1	1	1.081
	R	1	1	1.733	1	1	1	1	2.995	1	1	1.272
	Ho	0.0	0.0	0.067	0.0	0.0	0.0	0.0	0.267	0.0	0.0	0.033
	He	0.0	0.0	0.067	0.0	0.0	0.0	0.0	0.441	0.0	0.0	0.050
	F	----	----	-0.030	----	----	----	----	0.375	----	----	0.172
PCH	N	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
	Na	1	2	2	4	2	1	3	4	2	1	2.2
	Ne	1	1.095	1.172	1.234	1.071	1	1.606	1.506	1.252	1	1.081
	R	1	1.69	1.877	2.605	1.583	1	2.580	3.401	1.953	1	1.272
	Ho	0.0	0.091	0.159	0.182	0.023	0.0	0.341	0.227	0.227	0.0	0.033
	He	0.0	0.088	0.148	0.192	0.067	0.0	0.382	0.340	0.204	0.0	0.050
	F	----	-0.048	-0.086	0.041	0.665	----	0.097	0.324	-0.128	----	0.172
SAB-TIN	N	35	34	35	34	34	35	35	35	35	35	34.7
	Na	1	5	5	1	3	1	6	3	3	2	3.0
	Ne	1	1.592	3.059	1	1.883	1	1.698	2.125	2.731	1.059	1.715
	R	1	3.961	4.106	1	2.909	1	4.694	2.996	3	1.677	2.634
	Ho	0.0	0.147	0.371	0.0	0.235	0.0	0.229	0.257	0.686	0.000	0.193
	He	0.0	0.378	0.683*	0.0	0.476	0.0	0.417	0.537	0.643	0.056	0.319
	F	----	0.605	0.448	----	0.498	----	0.444	0.514	-0.082	1.000	0.490
V	N	30	30	30	29	30	30	30	30	30	30	29.9
	Na	3	5	10	13	9	13	12	8	9	13	9.5
	Ne	1.867	1.370	4.749	6.950	4.639	7.229	7.627	6.122	4.639	6.569	5.176
	R	2.975	3.335	7.686	8.994	7.410	9.203	8.950	7.099	7.296	9.301	7.224
	Ho	0.600	0.233	0.567	0.759	0.633	0.833	0.800	0.833	0.667	0.867	0.679
	He	0.472	0.275	0.803	0.871	0.798	0.876	0.884	0.850	0.798	0.862	0.748
	F	-0.292	0.136	0.282	0.114	0.193	0.033	0.079	0.004	0.150	-0.022	0.067
CAT	N	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
	Na	4	11	18	13	12	14	6	8	10	14	11
	Ne	1.865	7.116	7.470	6.660	7.860	8.837	4.390	5.408	4.404	9.197	6.320
	R	3.782	8.638	11.640	9.605	9.563	9.943	5.658	6.779	7.237	10.319	8.316
	Ho	0.423	0.577	0.885	0.923	0.846	0.846	0.692	0.654	0.769	0.577	0.719
	He	0.473	0.876*	0.883	0.867	0.890	0.904	0.787	0.831	0.788	0.909*	0.820
	F	0.088	0.329	-0.021	-0.086	0.031	0.046	0.103	0.198	0.005	0.353	0.104
TE-TA RTZ	N	118	118	118	118	118	118	118	118	118	118	118
	Na	14	11	23	20	17	18	13	15	20	15	16.6
	Ne	6.545	1.965	10.505	9.173	8.126	9.669	5.871	10.246	9.785	7.689	7.957
	R	7.604	9.904	12.468	11.031	10.960	12.070	10.020	9.948	8.927	10.953	10.388
	Ho	0.805	0.483	0.856	0.814	0.822	0.890	0.669	0.822	0.763	0.864	0.779
	He	0.851	0.493	0.909	0.895	0.881	0.900	0.833	0.906	0.902	0.874	0.844
	F	0.050	0.016	0.054	0.087	0.063	0.008	0.193	0.089	0.150	0.006	0.072

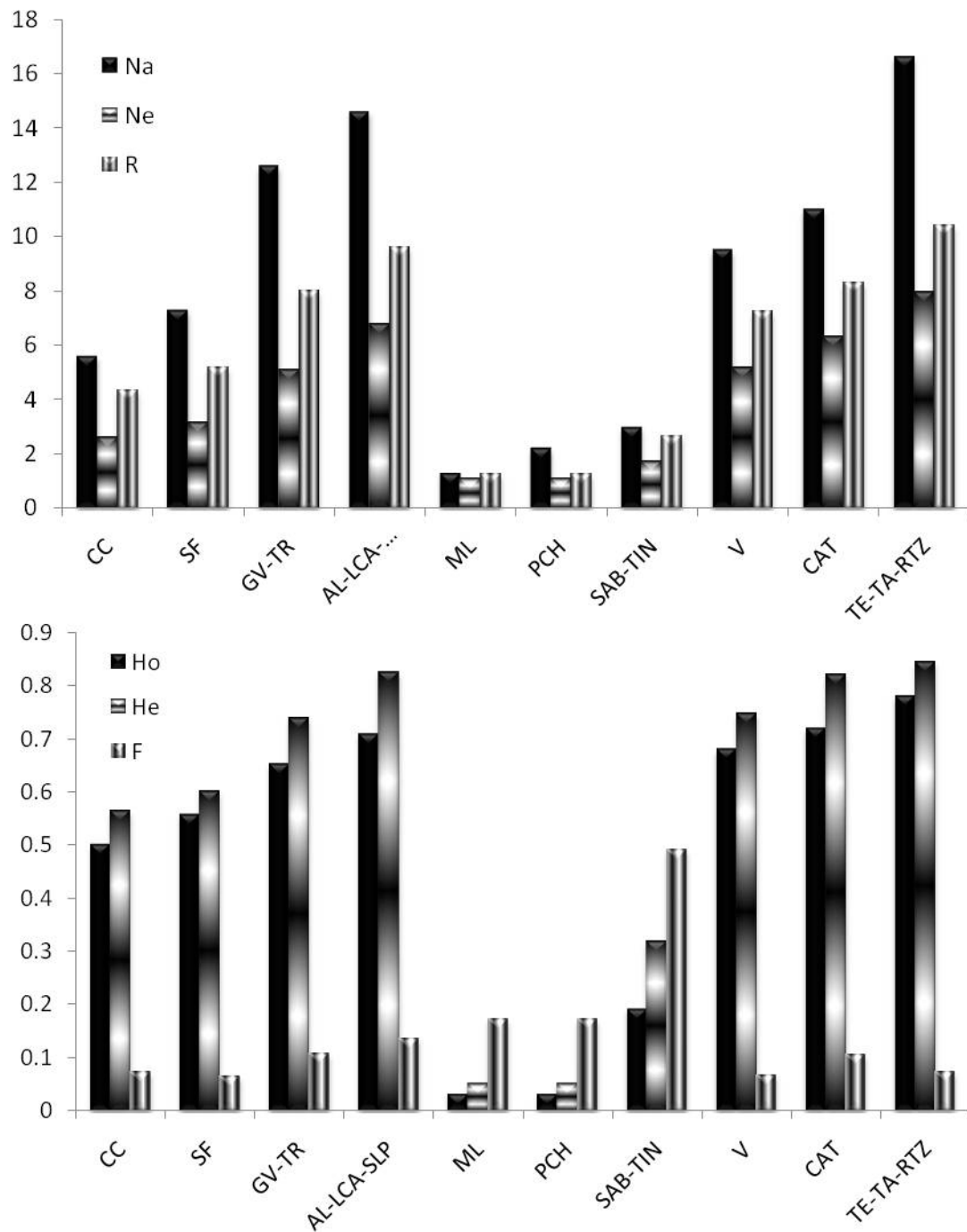


Figura 15. Valores promedio del número de alelos (Na), alelos efectivos (Ne), riqueza alélica (R), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada no sesgada (He) e índice de fijación (F) para las poblaciones muestreadas de *Astyanax mexicanus*. Los acrónimos de las localidades son definidos en la Tabla I.

8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación taxonómica de individuos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla IV y Tabla I del Anexo III, los individuos de las localidades norteñas de Cuatrociénegas, San Fernando, Troncones, La Cañada y Huichihuayan mostraron características morfológicas típicas de *Astyanax mexicanus*, mientras que las localidades sureñas de Teapa, Tapijulapa y Río Tzendales mostraron características de *Astyanax aeneus*, lo cual concuerda con las descripciones de Lozano-Vilano y Contreras-Balderas (1990) y Miller (2005). Sin embargo, como se puede apreciar en la Tabla III, estas características se sobrelapan entre *A. mexicanus* y *A. aeneus*, aunque los autores siguen clasificándolas como especies distintas. Así, *A. mexicanus* tiende a presentar en promedio un menor número de radios en la aleta anal y branquioespinas, localizándose en la parte norte de México, mientras que *A. aeneus* se le encuentra en la parte sur de México presentando en promedio un mayor número de radios en la aleta anal y de branquioespinas. En el presente trabajo se encontró una clina en dirección sur – norte para las branquioespinas y para el número de radios en la aleta anal, lo cual ya había sido reportado por Paulo-Maya (1994) tanto para la vertiente Atlántica como para vertiente Pacífica, proponiendo así el autor que esto se debe a cambios climáticos graduales dirección sur-norte, provocando la modificación gradual de las formas de *Astyanax*. Es posible que las distintas especies nominales de *Astyanax* que se han descrito para México (Contreras-Balderas y Lozano-Vilano, 1988; Schmitter-Soto, 2008) puedan tratarse en realidad de individuos representantes de un clinal morfológico, es decir, ser un reflejo del ambiente más que tratarse de especies distintas (Paulo-Maya, 1994).

Las distancias genéticas promedio entre las localidades de *A. mexicanus* son cuatro veces más grandes que las de *A. aeneus*, sin embargo, a pesar de esas diferencias, no parecen ser lo suficientemente importantes como para considerar que ambas estén genéticamente aisladas, además de que no existe un claro patrón de diferenciación genética. Por ejemplo, los individuos de la localidad de Cuatrociénegas presentan mayor distancia genética con Troncones (0.123), La Cañada (0.115) y Huichihuayan (0.017), donde todos los individuos son considerados como *A. mexicanus*, mientras que la distancia genética con respecto a las localidades sureñas de Teapa y Tapijulapa es

menor (0.087 y 0.098 respectivamente), las cuales son consideradas como *A. aeneus*. Por su parte San Fernando que es una localidad donde se distribuye de manera natural *Astyanax mexicanus* mostro valores de distancia genética semejantes entre localidades clasificadas como *A. mexicanus* (La Cañada, 0.094 y Huichihuayan, 0.091) que con localidades consideradas como *A. aeneus* (Tapijulapa, 0.091 y Río Tzendales, 0.096), lo que no refleja una clara separación a nivel genético entre ambas especies.

Con base en lo anterior, no se encontró por lo tanto una clara evidencia genética que soporte la separación de *Astyanax mexicanus* y *Astyanax aeneus*, y se apoya entonces la hipótesis de Paulo-Maya (1994), al considerar que las variaciones morfológicas de *Astyanax* son un reflejo del ambiente.

Por otra parte, Ornelas-García *et al.* (2008) encuentran grupos monofiléticos bien definidos en su reconstrucción filogenética y de acuerdo a su distribución geográfica establecen diferentes nombres científicos para cada grupo. Pero Hausdorf *et al.* (2011) usando 6 marcadores microsatélites, invalidan los cambios taxonómicos, ya que no observan una congruencia entre las distribuciones geográficas de los genotípicos nucleares y clados mitocondriales. Los individuos que muestran haplotipos mitocondriales más antiguos no son en realidad una unidad evolutiva independiente, pues al parecer estos pueden presentar de manera recurrente procesos de introgresión (mitocondrial) y por lo tanto no pueden ser clasificados como especies separadas. Asimismo Hausdorf *et al.* (2011) también observan que la separación entre *A. mexicanus* y *A. aeneus* propuesta por la literatura actual (Lozano-Vilano y Contreras Balderas, 1990; Schmitter-Soto, 1998; Ornelas-García *et al.*, 2008) no es soportada por datos genéticos y biogeográficos. El eje neovolcánico ha funcionado como una barrera biogeográfica para la dispersión de muchas especies de fauna y flora que se encuentra al norte y al sur de dicha región (Hulsey *et al.*, 2004); con diversos datos genéticos (Strecker *et al.*, 2003; Strecker *et al.*, 2004; Hausdorf *et al.*, 2011, incluyendo el presente trabajo) se ha probado que *Astyanax* ha podido traspasar el eje neovolcánico más de una vez, ya que individuos del norte (*A. mexicanus*) comparten genotipos con individuos del sur (*A. aeneus*), lo que habla de flujos genéticos más recientes que la formación de esa cadena montañosa (Hulsey *et al.*, 2004). Por lo tanto, los datos genéticos de loci microsatélites sugieren que no existe una real separación entre las

especies actualmente reconocidas, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente trabajo.

Por su parte, los individuos de Catemaco mostraron un número semejante de radios anales a *Astyanax aeneus*, aunque en promedio presentaron un mayor número de radios en la aleta pectoral y branquioespinas, pero igualmente se puede observar en la Tabla III, que estas características se sobreponen con las de *Astyanax*. Una de las características relevantes usadas para describir a *Bramocharax caballeroi* así como para diferenciarse de *Astyanax* es el dentario. Contreras-Balderas y Rivera-Teillery (1976) mencionaron que *Bramocharax caballeroi* presenta de 0 a 19 dientes maxilares con 5 cúspides y en la mandíbula presenta 5 a 6 dientes con 7 a 9 cúspides, mientras que *Astyanax* presenta de 0 a 7 dientes maxilares con solo 3 cúspides y 4 dientes mandibulares también con 3 cúspides, estos números no fueron encontrados en este trabajo, ya que tanto los individuos de Catemaco como los de *Astyanax* presentaron 5 cúspides (en promedio) en los dientes maxilares, aunque en Catemaco el número de dientes maxilares fue mayor (10 en promedio) que los presentes en *Astyanax* (7 en promedio), además en la mandíbula ambos presentaron en promedio 7 dientes con 5 cúspides.

Es de suponer que si *Bramocharax* es un género distinto, se esperaría que las distancias genéticas de Cavalli-Sforza y Edwards con respecto a *Astyanax mexicanus* y *Astyanax aeneus* fuesen mayores a las que se presentan dentro de *Astyanax*, sin embargo esto no se encontró, lo cual apoya la hipótesis de Ornelas-García *et al.* (2008) (Figura 16) al considerar a *Bramocharax* como un morfotipo mas dentro de la variación morfológica de *Astyanax*, no siendo la característica dentaria suficiente para separar ambos géneros.

Es evidente que *Astyanax* es un grupo que presenta una plasticidad biológica, describiéndose este término como la capacidad de mostrar variaciones fisiológicas, morfológicas y del desarrollo en respuesta a los cambios ambientales, siendo la norma de reacción una descripción estadística y gráfica del rango de fenotipos que pueden ser producidos en respuesta a diferentes ambientes. Esta norma de reacción refleja cómo la selección en dos o más ambientes afecta la expresión de un carácter (Callahan *et al.*, 1997). Básicamente en *Astyanax* se observan morfos distintos con poca distancia

genética, por lo que la taxonomía de *Astyanax* y *Bramocharax* debería de ser revisada cuidadosamente, con la opción de apoyarse en características genéticas.

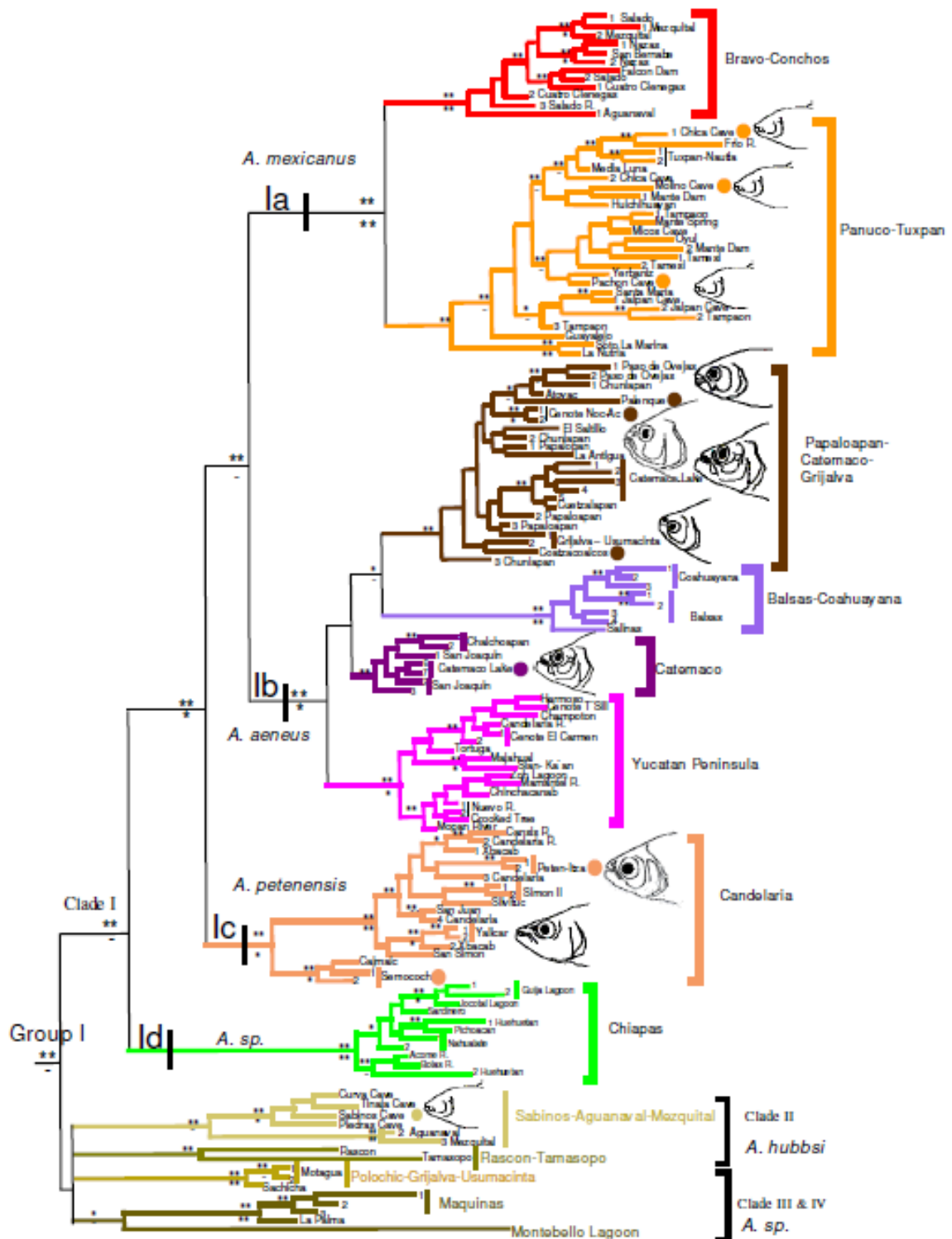


Figura 16. Tomada de Ornelas-García *et al.* (2008). Esta imagen muestra el subárbol (parte superior) con los métodos de Inferencia Bayesiana y Máxima Parsimonia para *Astyanax* y *Bramocharax* utilizando Citocromo b.

8.2 Número de poblaciones de *A. mexicanus* con AFC, valores de F_{ST} , AMOVA y Structure

El Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) mostró que las poblaciones de cuevas presentan una separación marcada con aquellas poblaciones de superficie (Figura 4), lo cual también se pudo apreciar en los valores obtenidos de F_{ST} (0.4685, $P = 0.00$). También se observaron mayores niveles de diferenciación entre las distintas cuevas (ML vs PCH = 0.8541, $P = 0.0$; ML vs SAB = 0.8158, $P = 0.0$; ML vs TIN = 0.8041, $P = 0.0$; PCH vs SAB = 0.7665, $P = 0.0$; PCH vs TIN = 0.7745, $P = 0.0$), aunque entre las cuevas de Sabinos (SAB) y Tinajas (TIN) presentaron los más bajos ($F_{ST} = 0.2682$, $P = 0.0$).

Por otra parte las localidades de Arroyo Lagartos (AL), La Cañada (LCA) y Huichihuayan (SLP) presentaron bajos niveles de diferenciación con respecto a las localidades sureñas de Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ), (AL vs TE = 0.0689, $P = 0$; AL vs TA = 0.0786, $P = 0$; AL vs RTZ = 0.0853; LCA vs TE = 0.0546, $P = 0$; LCA vs TA = 0.0760, $P = 0$; LCA vs RTZ = 0.0579, $P = 0$; SLP vs TE = 0.0574; $P = 0$; SLP vs TA = 0.0711, $P = 0$; SLP vs RTZ = 0.0758, $P = 0$), lo cual también se pudo apreciar gráficamente en la Figura 7 del AFC, así mismo las localidades de AL, LCA y SLP presentaron mayores niveles de diferenciación con las poblaciones de cuevas cercanas a ellas (AL vs ML = 0.0405, $P = 0$; AL vs PCH = 0.4478, $P = 0$; AL vs SAB = 0.3401, $P = 0$; AL vs TIN = 0.2666, $P = 0$; LCA vs ML = 0.4663, $P = 0$; LCA vs PCH = 0.5077, $P = 0$; LCA vs SAB = 0.4026, $P = 0$; LCA vs TIN = 0.3127; SLP vs ML = 0.4840, $P = 0$; SLP vs PCH = 0.5422, $P = 0$; SLP vs SAB = 0.3896, $P = 0$; SLP vs TIN = 0.2955, $P = 0$). Resultados semejantes fueron reportados por Strecker *et al.* (2003) quienes emplearon 6 marcadores microsatélites en las poblaciones de cuevas de Pachón, Sabinos, Tinajas y 2 poblaciones de superficie cercanas a estas y otras dos ubicadas en el estado de Quintana Roo. A diferencia del trabajo de Strecker *et al.* (2003), en este trabajo se incluyeron localidades más norteñas (Cuatrociénegas (CC), San Fernando (SF), Garza Valdez y Troncones (TR)), las cuales presentan niveles de diferenciación más elevados con las poblaciones de cuevas, que con las localidades sureñas de Teapa, Tapijulapa y Río Tzendales (Tabla VI).

Las localidades de Garza Valdez (GV) y Troncones (TR) formaron un grupo homogéneo (Figura 7). Las localidades más sureñas: Teapa (TE), Tapijulapa (TA) y Río Tzendales (RTZ) también formaron otro grupo homogéneo entre sí, pero diferente del resto, lo cual concordó con los resultados obtenidos de F_{ST} (GV vs TR = 0.0119, $P = 0$; TE vs TA = 0.0095, $P = 0$; TE vs RTZ = 0.0165, $P = 0$ y TA vs RTZ = 0.0095, $P = 0$). Igualmente se pudo apreciar que las localidades de Cuatrociénegas (CC), San Fernando (SF), El Zapotal (V) y Catemaco (CAT) formaron poblaciones distintas, esta diferenciación coincide con la ocurrencia en cuencas hidrológicas distintas: Bravo, San Fernando, Tuxpan y Papaloapan respectivamente y también concordantes con los valores de F_{ST} obtenidos (Tabla VI).

Finalmente, tenemos que la población de Catemaco, considerada un género distinto (*Bramocharax caballeroi*) mostró bajo nivel de diferenciación con las poblaciones norteñas de Garza Valdez (GV; 0.0902, $P = 0$), Troncones (TR; 0.0957, $P = 0$), aunque significativamente diferente, lo cual se discutirá más adelante.

En lo que respecta al Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), de los 4 modelos planteados, el modelo D (10 grupos) mostró la máxima varianza entre grupos, ya que el modelo B basado en grupos filogenéticos (Ornelas-García *et al.*, 2008), así como el modelo C por cuencas hidrológicas mostraron bajos niveles de varianza entre grupos (Tabla VII). El modelo D se basó en los niveles de F_{ST} obtenidos, y como ya se mencionó, este patrón de diferenciación concuerda con las cuencas hidrológicas a las cuales pertenecen las distintas localidades, más las cuevas. En el trabajo de Strecker *et al.* (2003) utilizando microsatélites, también realizaron un AMOVA y reportan valores del 71.79 al 73.03 de varianza dentro de las poblaciones, lo cual coincide con los resultados de este estudio (Tabla VII).

En general, los análisis de AFC, AMOVA y los valores de F_{ST} pareados mostraron alta congruencia, y apoyan la hipótesis que las muestras analizadas con un juego de 10 loci microsatélites conforman un total de 10 poblaciones. Además el valor F_{ST} promedio en el presente trabajo ($F_{ST} = 0.285$) concuerda con los valores promedio reportados ($F_{ST} = 0.222$) en peces de agua dulce, aunque estos fueron a partir de isoenzimas (Waples, 1998).

Por su parte, las pruebas de asignación de individuos realizadas por métodos bayesianos utilizando el programa STRUCTURE apoyan la hipótesis de que los sitios de muestreo analizados conforman 10 poblaciones genéticamente distintas (Figuras 8A y 8B), confirmando los hallazgos observados con los análisis de AFC, AMOVA y F_{ST} .

De acuerdo con Evanno *et al.* (2005), el algoritmo que utiliza STRUCTURE tiene la capacidad de detectar un nivel de estructuración superior con un número mínimo de 10 loci microsatélites o 100 bandas de AFLPs. Como se puede apreciar en la figura 8B, el programa detecto en primera instancia mediante un pico más alto a las tres poblaciones de cuevas, (Molino, Pachón y Sabinos/Tinajas) y con un segundo pico, identifico al grupo de superficie compuesta por 7 poblaciones (Cuatrociénegas, San Fernando, Garza Valdez/Troncones, Arroyo Lagartos/La Cañada/Huichihuayan, El Zapotal, Catemaco y Teapa/Tapijulapa/Río Tzendales), cabe señalar que este programa pudo detectar estas diferencias ya que los valores de F_{ST} mostraron ser superiores a 0.02, pues valores más bajos a estos, STRUCTURE tiende a no identificar correctamente el número de poblaciones (Latch *et al.*, 2006).

A la fecha existe una gran cantidad de literatura que emplea el programa de STRUCTURE para detectar el número de poblaciones distintas en peces de agua dulce (Duftner *et al.*, 2006), peces marinos (Mobley *et al.*, 2010), anfibios (Wang y Summers, 2010), reptiles, (Esquer, 2008), aves (Friesen *et al.*, 2006) y mamíferos (Cegelski *et al.*, 2003; Estes-Zumpf *et al.*, 2010). En todos estos trabajos, los valores de F_{ST} fueron superiores a 0.02, lo que permitió detectar poblaciones genéticamente homogéneas (Latch *et al.*, 2006). Los valores mayores a 0.02 parecen ser una condición necesaria para que el programa de resultados confiables sobre el número de poblaciones en un juego de muestras analizadas mediante la variación de microsatélites. El valor promedio de F_{ST} en este estudio fue de 0.285, por lo que hay suficiente certidumbre para confirmar la existencia de 10 grupos genéticamente homogéneos en el juego de datos analizados.

8.3 Similitudes genéticas mediante la reconstrucción de dendrogramas en *Astyanax mexicanus*

El dendrograma reconstruido a partir de distancias genéticas de Cavalli-Sforza y Edwards (Figura 10), mostró un patrón similar a los resultados observados con todos los métodos anteriores (AFC, F_{ST} , AMOVA y STRUCTURE), con un soporte estadístico de mediano a alto para la mayoría de las ramas (47.7% al 99.9%). Se detectó un clado bien soportado (99.5%) conformado por las poblaciones de cuevas de Sabinos y Tinajas, y con menos soporte (49.9% y 55.7%) a las poblaciones de cuevas de Pachón y Molino (respectivamente), no obstante todas las poblaciones de cuevas tienden a agruparse juntas y distantes de las de superficie. La rama que incluye a las poblaciones más norteñas muestra a la población de Cuatrociénegas con bajo soporte (23.4%), a San Fernando con un soporte moderado (54.5%) y Troncones con Garza Valdez mostraron estar muy bien soportadas (99.9%), lo cual indica que son muy semejantes entre sí. En lo que respecta a la rama inferior, esta contiene a las poblaciones cercanas a las cuevas y a las sureñas, en esta rama se aprecia como las localidades de Tapijulapa, Teapa y Río Tzendales están muy bien soportadas (95.7%), mientras que las localidades de El Zapotal y Catemaco están pobremente soportadas (18.6% y 32.6%, respectivamente), y a diferencia de los resultados obtenidos con los métodos anteriores, la localidad de La Cañada pobremente soportada (17.8%) se encuentra separada de las localidades de Arroyo Lagartos y Huichihuayan, estando estas dos últimas moderadamente soportadas (47.7%). Es importante señalar que la construcción de este árbol se basó en el empleo de las frecuencias alélicas de cada localidad para generar una matriz de distancias genéticas D_{CE} , ya que estas no hacen referencia a ningún modelo evolutivo, y se considera una tasa de mutación constante entre loci, por lo que la topología del árbol ha sido interpretada como la que da mejores relaciones genética entre las unidades taxonómicas analizadas (Spruell *et al.*, 2003).

El dendrograma de este trabajo concuerda parcialmente con lo reportado por Strecker *et al.* (2003) quienes usaron 6 loci microsatélites, tres de los cuales fueron usados en el presente estudio, aunque su árbol (Figura 17) lo reconstruyen en base a las distancias de Nei. No obstante también se puede apreciar que las poblaciones de cuevas se agrupan en una rama, mostrando una estrecha relación las cuevas de Sabinos y

Tinajas; la rama intermedia está conformada por la cueva La Chica y las poblaciones de superficie cercanas a las cuevas y la rama inferior está integrada por las localidades de Quintana Roo.

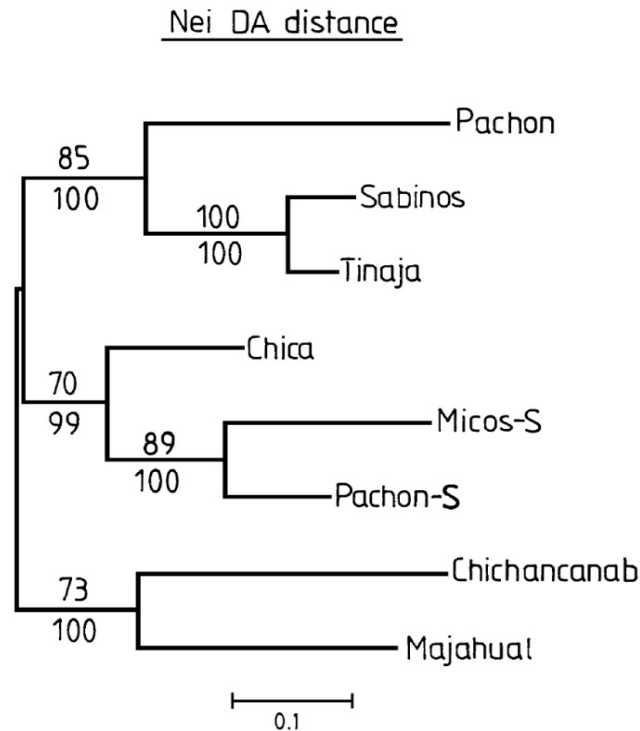


Figura 17. Ilustración tomada de Strecker *et al.*, 2003, muestra un árbol Neighbour-Joining que describe las relaciones entre las poblaciones de cuevas y las de superficie basado en las medidas de distancia de Nei y usando un juego de con 6 loci microsatélite. Los números sobre las líneas son los valores de bootstrap basado en el locus (número superior) o de manera individual (número inferior).

Sin embargo, mediante secuencias del Citocromo b y usando el mismo algoritmo de reconstrucción filogenética (NJ), Strecker *et al.* (2003) observaron que individuos de las cuevas de Sabinos y Tinajas se encuentra en una rama distinta y más alejada de la cueva de Pachón, y también encontraron una mayor relación entre las poblaciones de superficie, que entre las poblaciones de cuevas y las de superficie cercanas a estas, con excepción de Pachón, ya que esta última está estrechamente relacionada con las poblaciones circundantes. Una explicación de lo anterior probablemente se deba un evento de hibridación introgresiva, en donde el haplotipo de ADN mitocondrial original en Pachón fue parcial o totalmente sustituido (Dowling *et al.*, 2002). En el trabajo de Strecker *et al.* (2003), las distancias genéticas estimadas mediante secuencias del ADN

mitocondrial y a partir de los microsatélites mostraron concordancia, sugiriendo así que la divergencia entre poblaciones de cuevas y superficie ha ocurrido desde un periodo relativamente largo, y proponen que las poblaciones de cuevas se originaron de un grupo ancestral diferente a las poblaciones de superficie contemporáneas.

Con un muestreo más amplio a lo largo de la vertiente Atlántica incluyendo poblaciones del Pacífico, Guatemala y Belice y usando secuencias del Citocromo b del ADN mitocondrial, Strecker *et al.* (2004) vuelven a obtener resultados similares a Strecker *et al.* (2004), donde el árbol Neighbour-Joining agrupa en una rama a las cuevas de Piedras, Curva, Sabinos y Tinajas (las cuales se encuentran geográficamente en el estado de San Luis Potosí), presentando una menor distancia con las ramas que incluyen a las poblaciones Pacífico y a las ramas compuestas por las poblaciones sureñas del Golfo de México, mientras que poblaciones geográficamente cercanas a estas (Norte del Golfo de México) presentan distancias genéticas mayores con respecto a la de estas cuevas. Comparando lo anterior con los resultados obtenidos en este trabajo, se vuelve a observar que las poblaciones de superficie sureñas presentan una menor distancia con aquellas que circundan a las cuevas, que entre estas últimas y las cuevas, siendo además las cuevas de Sabinos/Tinajas las que presentan una mayor distancia a las poblaciones de superficie en comparación con la cuevas de Molino y Pachón, lo que puede reflejar tiempos de divergencia mayores para las cuevas de Sabinos/Tinajas.

El dendrograma elaborado en este trabajo incluye más localidades y una mayor cobertura del área de estudio a lo largo de la vertiente Atlántica mexicana y se consideró incluir poblaciones de los dos linajes de cuevas propuesto por Strecker *et al.* (2003) y Ornelas-García *et al.* (2008). En este dendrograma (Figura 10) se aprecia que la rama que contiene a las poblaciones de cuevas, son Sabinos/Tinajas las que muestran mayor distancia con respecto a las poblaciones de superficie reflejando posiblemente un tiempo de divergencia mayor a los que presentan las cuevas de Pachón y Molino, ya que estas se encuentran más cercanos a las poblaciones superficie, lo cual sería indicativo de las dos eventos de olas de dispersión hacia las cuevas, y se refuerza con niveles de diferenciación menores entre las Cuevas de Sabinos/Tinajas y las localidades del Sur (F_{ST} promedio = 0.3391) que entre estas cuevas y las localidades del Norte (F_{ST}

promedio = 0.4198). No obstante, a diferencia de lo reportado anteriormente por los autores citados, en este estudio se añadió poblaciones norteñas a las cuevas, dejando a la rama de las poblaciones de cuevas en una posición intermedia entre las poblaciones norteñas y sureñas. Esta estructura no concuerda con la hipótesis de dos eventos de dispersión, por lo que es posible que haya habido al menos otro evento de dispersión con dirección sur-norte en tiempos más recientes en las poblaciones de superficie.

Otro hallazgo no reportado anteriormente es una menor distancia genética entre la cuenca Soto la Marina (Garza Valdez/Troncones) con respecto al Bravo (Cuatrociénegas) y San Fernando (San Fernando) (Figura 10), mientras que la reconstrucción filogenética de Ornelas-García *et al.* (2008) muestra una menor distancia genética entre la cuenca de Soto la Marina (Soto la Marina y La Nutria) (Figura 16) con las localidades pertenecientes al Pánuco incluyendo las cuevas, ya que se agrupan dentro del mismo clado. Posiblemente las cuencas de Soto la Marina y el Pánuco en el pasado se mantuvieron conectadas por algún río, mientras que con las cuencas más norteñas (Bravo y San Fernando) no presentó tal contacto. Esto no se vio reflejado en el dendrograma reconstruido por los microsatélites obtenido a partir de los datos del presente estudio, mostrando la limitación de estos marcadores para reconstruir eventos históricamente más remotos.

Los estudios de Strecker *et al.* (2003, 2004), Ornelas-García *et al.* (2008) y Dowling *et al.* (2002), reportan un patrón de distribución filogeográfica sur – norte, con excepción del clado que incluye a las cuevas de Piedras, Curva, Tinajas y Sabinos, sin embargo este patrón no se encontró con los análisis realizados en este estudio (aunque no se emplearon individuos de las cuevas de Piedras y Curva). La ocurrencia de 2 linajes distintos en la región de la Sierra del Abra, fue interpretado por los estudios anteriores como dos eventos de dispersión de *Astyanax* a las cuevas; el primer evento de dispersión se propone que ocurrió entre 1.8 y 4.5 millones de años, con un promedio de 3.1 millones de años, lo cual concuerda con la clausura del Istmo de Panamá (3.3 millones de años), y el segundo evento posiblemente ocurrió durante el Pleistoceno o el Plioceno tardío, en esos tiempos las aguas superficiales se enfriaron llevado así a la extinción a *Astyanax* en Norteamérica, siendo algunas cuevas y aquellas localidades más sureñas las que pudieron haber funcionado como refugios (Strecker *et al.*, 2003 y

2004). Las cuevas generalmente proveen un ambiente con temperatura constante, permitiendo así la subsistencia de especies durante fluctuaciones climáticas. Subsiguientemente, el clima empezó nuevamente a calentarse y otra ola de invasión nuevamente empezó hacia el norte. Estos argumentos podrían explicar por qué en este trabajo, las poblaciones cercanas a las cuevas (Arroyo Lagartos/La Cañada/Huichihuayan) muestran niveles de divergencia y distancias genéticas menores con las poblaciones sureñas en comparación a las poblaciones de cuevas cercanas a estas, es decir, las poblaciones de superficie de esta región representarían la segunda ola de invasión. Ahora bien, si se acepta la hipótesis de que las poblaciones de superficie pertenecen a la segunda ola de dispersión de *Astyanax*, entonces las poblaciones de Cuatrociénegas, San Fernando y Garza Valdez/Troncones, poblaciones no estudiadas previamente, deberían presentar niveles de divergencia similares a las que presentan las poblaciones circundantes a las cuevas con respecto a las poblaciones del sur, sin embargo esto no es el caso, ya que estas poblaciones norteñas presentan niveles de divergencia mayores con respecto a las poblaciones del sur y también presentan niveles de divergencia ligeramente más elevados con respecto a las poblaciones de cuevas. Lo anterior podría explicarse por la ocurrencia de otra ola invasiva originaria del sur en tiempos más recientes.

Los procesos de aislamiento y colonización de *Astyanax* en México están calculados entre 11,000 y 900,000 años según Strecker *et al.* (2004) mediante el análisis de clados anidados. La planicie costera del Golfo de México fue más ancha durante el Pleistoceno de lo que es en la actualidad, este factor posiblemente facilitó la dispersión hacia el norte de los ancestros de las poblaciones actuales de *Astyanax*, y con un ambiente más lluvioso y ríos de gran caudal, estas poblaciones pudieron llegar al Río Bravo y posteriormente a los ríos como el Nazas-Aguanaval y Conchos. Después de algún tiempo se promovió el aislamiento debido al incremento de las condiciones áridas, transformándose y reduciéndose el antiguo hábitat (Miller y Smith, 1986; Paulo-Maya, 1994), tal situación provocó el aislamiento de poblaciones tales como Cuatrociénegas, la cual mostró ser una población genéticamente distinta a las demás, aunque sigue mostrando menor grado de divergencia (F_{ST}) con respecto a las poblaciones más sureñas (CC vs TE = 0.1636, $P = 0$; CC vs TA = 0.1839, $P = 0$; CC vs RTZ 0.1903, $P = 0$), que con poblaciones cercanas a esta (CC vs SF = 0.2696, $P = 0$;

CC vs GV = 0.2624, P = 0; CC vs GV = 0.2587, P = 0). Los valores de F_{ST} muestran que las poblaciones del norte han permanecido aisladas desde un tiempo relativamente largo, pues se encuentran altamente estructuradas, lo que concordaría con la segunda ola invasiva.

Además de los cambios ambientales, las barreras geográficas también pudieron haber influenciado la distribución de *Astyanax*, hacia la parte norte y sur de la planicie Atlántica. Esta planicie está geográficamente separada por el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano (CVTM) (Strecker *et al.*, 2004; Ornelas-García *et al.*, 2008), esta estructura ha sido descrita como una barrera biogeográfica para la dispersión por Hulsey *et al.* (2004), sin embargo los valores de F_{ST} y de distancias genéticas obtenidas en este trabajo no soportan dicha hipótesis, ya que poblaciones tan norteñas como Cuatrociénegas, San Fernando, Garza Valdez/Troncones y Arroyo Lagartos/La Cañada/Huichihuayan presentan menor grado de divergencia con poblaciones sureñas (Teapa/Tapijulapa/Río Tzendales) que entre las poblaciones norteñas. Es posible que el CVTM no haya sido una barrera que impida el flujo genético en *Astyanax*.

8.4 Aislamiento por distancia

Al considerar todas las localidades de muestreo, incluyendo las poblaciones de cuevas, no fue posible observar una relación significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética ($R^2 = 0.0787$ y $P = 0.908$). Las hipotéticas invasiones dirección sur-norte que han sido reportadas para *Astyanax* a lo largo de la vertiente Atlántica Mexicana (Strecker *et al.*, 2003 y 2004; Dowling *et al.*, 2002 y Ornelas-García *et al.*, 2008), puede explicar la ausencia de este aislamiento por distancia. Sin embargo, si la hipótesis de la existencia de dos olas invasivas por parte de *Astyanax* es cierta, entonces la segunda ola de invasión debe de reflejar en las poblaciones de superficie un aislamiento por distancia (excluyendo Catemaco), resultado que no se obtuvo en este trabajo ($R^2 = 0.067$ y $P = 0.125$). La prueba Mantel para las localidades del norte (Cuatrociénegas, San Fernando, Garza Valdez, Troncones, Arroyo Lagartos, La Cañada, Huichihuayan y El Zapotal), resultó en una relación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica ($R^2 = 0.696$ y $P = 0.0$), además, cada una de

estas localidades también demostró tener una relación significativa ($R^2 = 0.633$ y $P = 0.0$) con las localidades del sur (Teapa, Tapijulapa y Río Tzendales, excluyendo Catemaco). Estos resultados apoyan la segunda ola de invasión, la cual se puede observar en las localidades del norte, mientras que la estrecha relación de las localidades del norte con las localidades del sur se puede explicarse con la idea de una tercera ola invasiva de *Astyanax* en tiempos más recientes. Este hecho nuevamente demuestra que la barrera del CVTM no parece ser una restricción para el contacto entre ambas regiones.

Por otro lado, la población de Catemaco, la cual fue excluida en las pruebas de Mantel anteriores, presentó bajos niveles de diferenciación con la población de Garza Valdez/Troncones. Este nivel de diferenciación genética entre ambas poblaciones no se puede explicar mediante un desplazamiento dirección sur-norte originaria de Catemaco, ya que la diferenciación genética con poblaciones más cercanas a Catemaco como lo son El Zapotal, Huichihuayan, La Cañada y Arroyo Lagartos muestran ser mayores y por lo tanto no existiría un aislamiento por distancia. Ahora bien, esto puede tener dos posibles explicaciones. La primera hipótesis o explicación puede ser una señal genética ancestral, ya que como se puede observar en la reconstrucción filogenética de Ornelas-García *et al.* (2008; Figura 16) las localidades de Soto la Marina y La Nutria pertenecientes a la cuenca de Soto la Marina (dentro del clado Pánuco-Tuxpan) presentan menor distancia genética con las localidades de Catemaco, lo cual podría explicar la poca divergencia encontrada en este trabajo entre la población de Garza/Valdez perteneciente a la cuenca de Soto la Marina con respecto a Catemaco. La otra explicación alternativa es la intervención antropogénica, ya que es posible que durante la introducción de la lobina negra (*Micropterus salmoides*) al Lago Catemaco (Andrade-Escobar, 2006; DOF, 2007) a partir de poblaciones de la cuenca del Soto la Marina, particularmente de la Presa Vicente Guerrero, se haya también introducido la especie forrajera *Astyanax mexicanus* de dicha región, lo cual explicaría los bajos niveles de diferenciación genética observados entre poblaciones de Catemaco y Soto la Marina separadas geográficamente. Si lo anterior es cierto, los estudios de este tipo utilizando marcadores nucleares de tasa mutacional elevada, pueden develar efectos antropogénicos, lo cual suele ser difícil de identificar mediante otro tipo de marcadores moleculares (por ejemplo los marcadores mitocondriales).

8.5 Variación de microsatélites y medidas de diversidad genética

De los 10 loci empleados en el presente trabajo se obtuvieron desviaciones significativas al EHW en la población de Garza Valdez/Troncones (GV-TR) en el locus Xa3, Arroyo Lagartos/La Cañada/Huichihuayan (AL-LCA-SLP) en los loci Ast02, las cuevas de Sabinos/Tinajas (SAB-TIN) en el locus Ast02 y finalmente Catemaco (CAT) en los loci Ast10 y VF3, debido a un exceso de heterocigotos, sin embargo al presentarse un equilibrio multilocus por poblaciones, estas desviaciones no se tomaron en cuenta.

Los resultados tampoco mostraron desequilibrio de ligamiento, esto es predecible ya que la mayor parte de los loci que se emplearon en este estudio (Protas *et al.*, 2006) se encontraron en grupos de ligamiento distintos. Por lo que existe seguridad que todos los loci usados en el presente estudio se segregan de manera independiente.

En lo que se refiere a las medidas de diversidad genética, tales como el número de alelos por locus, riqueza alélica y la heterocigocidad esperada (H_e) se obtuvieron valores bajos en las poblaciones de cuevas (Molino, Pachón, Sabinos y Tinajas), mientras que las poblaciones de superficie presentaron valores mucho más elevados, lo cual ya se había reportado anteriormente para un grupo de peces dulceacuícolas de la familia Balitoridae, conocidos comúnmente como lochas de río que también están compuestos por especies troglobias y de superficie (Borowsky y Vidthayanon, 2001), así como en *Astyanax mexicanus* con: isoenzimas (Awise & Selander 1972); ND2 (Dowling *et al.*, 2002); microsatélites (Strecker *et al.*, 2003); Citocromo b (Strecker *et al.*, 2004) y RAPD's (Panaram y Borowsky, 2005).

Las cuevas están constituidas por poblaciones de tamaño pequeño en comparación con las de superficie, por lo que es probable que la deriva génica haya reducido los niveles de diversidad genética (Awise y Selander, 1972); aunado a esto, las características ecológicas en cuevas que las hacen drásticamente diferentes a las de superficie, como lo es la disponibilidad de alimento; o bien, el hecho que estén sujetas a cuellos de botella recientes, causados por temporadas de sequía en el área; acentúan los efectos de la deriva, influyendo de manera importante en la diversidad genética de los individuos habitantes de las cuevas (Mitchell *et al.*, 1977, Strecker *et al.*, 2003).

9. CONCLUSIONES

- A. Este es uno de los primeros estudios genéticos usando microsatélites que incluyen poblaciones de *Astyanax* de superficie a lo largo de la Vertiente Atlántica Mexicana, que incluye poblaciones norteñas a las cuevas.
- B. Los individuos de las poblaciones norteñas de la Vertiente Atlántica Mexicana fueron identificados de acuerdo a los criterios taxonómicos imperantes como *Astyanax mexicanus*, mientras que las poblaciones sureñas fueron identificados como *Astyanax aeneus*, sin embargo las distancias genéticas microsatelitales entre las dos especies/morfos no soporta tal distinción.
- C. Los individuos de Catemaco no corresponden a la descripción de *Bramocharax caballeroi* ya que mostraron características compartidas con *Astyanax*, así mismo no mostró distancias genéticas más elevadas a las que se presentan dentro de *Astyanax*, por lo que podría considerarse como otro morfo dentro de *Astyanax*.
- D. *Astyanax* de superficie presenta alta plasticidad morfológica, ya que morfotipos distintos (norteños contra sureños) presentan poco grado de diferenciación genética, mientras que morfos iguales (de cuencas hidrológicas cercanas) presentan mayor grado de diferenciación genética. El morfotipo extremo troglobio es otra variante altamente distinta tanto genética como morfológicamente. Estas evidencias resaltan la necesidad de una amplia revisión taxonómica de *Astyanax*.
- E. Se determinó la existencia de 10 poblaciones genéticamente homogéneas de *A. mexicanus* a lo largo del área del estudio mediante los análisis de 10 loci microsatélites usando varios procedimientos estadísticos (AFC, F_{ST} , AMOVA, y STRUCTURE).
- F. Las poblaciones de cuevas (Molino, Pachón, Sabinos/Tinajas) mostraron mayores niveles de diferenciación y distancias genéticas en comparación a las que presentaron las poblaciones de superficie.
- G. Las poblaciones cercanas a las cuevas mostraron menor grado de divergencia con las poblaciones sureñas que con las poblaciones de cuevas.
- H. El dendrograma construido a partir de distancias genéticas de Cavalli-Sfoza y Edwards mostró un patrón muy similar a lo encontrado con los análisis de AFC,

F_{ST} , AMOVA, y STRUCTURE, pero al añadir por primera vez poblaciones norteñas a las cuevas, se observó que las poblaciones de cuevas forman un grupo intermedio entre las poblaciones norteñas y sureñas.

- I. No se observó un aislamiento por distancia, lo que nuevamente se ratifica la existencia de dos olas de colonización para las poblaciones de cuevas.
- J. Se encontró un aislamiento por distancia en las poblaciones norteñas, lo que corrobora la segunda ola de dispersión, mientras que la relación significativa de cada población norteña con las poblaciones sureñas (excepto Catemaco), hipotetizaría una tercera ola de dispersión.
- K. La población de Catemaco mostró bajos niveles de diferenciación con la población norteña de Garza Valdez/Troncones, lo cual probablemente se deba a una señal genética ancestral o a la actividad antropogénica.

10. LITERATURA CONSULTADA

- Álvarez del Villar, J. 1970. Peces mexicanos (claves). Ser. *Inv. Pesq. Inst. Nal. Biol. Pesq., Mex.* 1: 1-16.
- Andrade-Escobar, K. 2006. Los Tuxtlas: Especies exóticas invasoras en las Reservas de las Biosfera. CONABIO.
- Avice J.C. y R.K. Selander. 1972. Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of genus *Astyanax*. *Society for the Study of Evolution*. 26(1): 1-19.
- Baird S.F. y C.F. Girard. 1854. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U. S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U.S.A. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24-29.
- Bassam, B.J. y G. Caetano-Anollés. 1993. Silver staining of DNA in Polyacrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42 (2): 181-188.
- Belkhir, K., P. Borsa, J. Goudent y F. Bonhomme. 1999. Genetix program package version 4.0. Laboratoire Génome et Populations. USTL. Université de Montpellier II, Montpellier, Francia.
- Borowsky R.L. y C. Vidthayanon. 2001. Nucleotide diversity in populations of balitorid cave fish from Thailand. *Molecular Ecology*, 10: 2799-2805.
- Brookfield, J.F. 1996. A simple method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5, 453-455.
- Carlsson, J. 2008. Effect of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity*, 99(6): 616-623.
- Castric, V.L. Bernatchez, K. Belkhir y F. Bonhomme. 2002. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. *Heredity*, 89: 27-35.
- Cavalli-Sforza, L.L y A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: model and simulation procedures. *Evolution*, 32: 550-570.
- Cegelski, C.C., L.P. Waits y N.J. Anderson. 2003. Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Molecular Ecology*, 12: 2907-2918.
- Chapuis, M.P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.

- Contreras-Balderas, S. y L. Lonzano-Vilano. 1998. Problemas nomenclaturales de las formas mexicanas del género *Astyanax* (Pisces:Characidae). ENCB-IPN. Zoología informa, 38: 1-13.
- Diario Oficial de la Federación. 2007. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-PESC-2004, Pesca responsable en el lago de Catemaco, ubicado en el Estado de Veracruz. Especificaciones para el aprovechamiento de los recursos pesqueros.
- Dempster A.P., N.M. Laird y D.B. Rubin. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. Roy Stat. Soc. B* 39: 1-38.
- Dowling, T.E, D.P. Martasina, W.R. Jeffery. 2002. Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 446-455.
- Duftner N, K.M. Sefc, S. Koblmüller, B. Nevado, E. Varheyen, H. Phiri y C. Sturmbauer. 2006. Distinct population structure in a phenotypically homogeneous rock-dwelling cichlid fish from Lake Tanganyika. *Molecular Ecology*, 15: 2381-2395.
- Earl, D.A. 2011. Structure Harvester v0.6.5 Available at http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/
- Espinasa L, y P. Rivas-Manzano y H. Espinoza. 2001. A new blind fish population of genus *Astyanax*: geography, morphology and behavior. *Environmental Biology of Fishes*, 62: 339-344.
- Espinasa L, y R. Borowsky. 2001. Origins and relationship of cave populations of the blind Mexican tetra, *Astyanax fasciatus*, in the Sierra de El Abra. *Environmental Biology of Fishes*, 62: 233-237.
- Excoffier, L. y H.E.L. Lischer. 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.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Felstein, J. 2001. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6 (alpha) Department of Genetics, University of Washington: Seattle, Washington.

- Friesen, V.L., J.A. González y F. Cruz-Delgado. 2006. Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*, 7: 105-115.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- Hausdorf, B., H. Wilkens y U. Strecker. 2011. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 89-97.
- Hulseay, C.D., F.J. García de León, Y. Sánchez-Johnson, D.A. Hendrickson y T.J. Near. 2004. Temporal diversification of Mesoamerican cichlid fishes across a major biogeographic boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 754-764
- Jeffery, W.R., A.G. Strickler, S. Guiney, D.G. Heyser y S.I. Tomarev. 2000a. Prox1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish, *Astyanax*. *Dev. Genes Evol.* 2(10): 223–230.
- Jeffery, W.R., y D.P. Martasian. 1998. Evolution of eye regression in the cavefish *Astyanax*: Apoptosis and the pax6 gene. *Am. Zool.* 38, 685–696.
- Jeffery, W.R., y Y. Yamamoto. 2000b. The lens as a regulator of craniofacial development and evolution in the teleost *Astyanax*. *Dev. Biol.* 222-239.
- Latch, E.K., G. Dharmarajan, J.C. Glaubitz y O.E. Rhodes Jr. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*, 7: 295-302.
- Lozano-Vilano, M.L. y S. Contreras. 1990. *Astyanax armandoi*, n. sp. from Chiapas, Mexico (Pisces, Ostariophysi: Characidae) with comparison to the nominal species *A. aeneus* y *A. mexicanus*. *Universidad y Ciencia*, 7: 97-107.
- McConney, M.E., N. Chen, D. Lu, H.A. Hu, S. Coombs, C. Liu y V.V. Tsukruk. 2009. Biologically inspired design of hydrogel-capped hair sensors for enhanced underwater flow detection. *Soft Matter*, 5: 292-295
- Miller, R.R. y M.L. Smith. 1986. Origin and Geography of fishes of central Mexico. Cap 14:487-517. En: *The Zoogeography of North American Fishes*. Hocutt, Ch.H y E.D. Wiley, Eds. Wiley Interscience.

- Miller, R.R. 2005. Freshwater fishes of Mexico. University of Chicago Press. 490 p.
- Mitchell R.W, W.H. Rossell y W.R. Elliott. 1977. Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution. Special Publications of the Museum of Texas Technical University, 12.1-89.
- Morales-Mejia, J. 1988. Bionomía y ciclo de vida de la sardina plateada *Astyanax mexicanus* (Filippi, 1853) en la presa Rodrigo Gómez, “La Boca”, Santiago, Nuevo León, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 52 pp.
- Mobley, K.B., C.M. Small, N.K. Jue y A.G. Jones. 2010. Population structure of the dusky pipefish (*Syngnathus floridae*) from the Atlantic and Gulf of Mexico, as revealed by mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *Journal of Biogeography*, 37: 1363-1377.
- Nei, M. y N. Takezaki. 1996. The root of the phylogenetic tree of human populations. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 170-177.
- Ornelas-García C.P., O. Domínguez-Domínguez y I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 340.
- Paulo-Maya, J. 1994. Análisis morfométrico del genero *Astyanax* (Pisces: Characidae) en México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, 107 pp.
- Peleshanko, S., M.D. Julian, M. Ornatska, M.E. McConney, M.C. LeMieux, N. Chen, C. Tucker, Y. Yang, C. Liu, J.A.C. Humphrey y V.V. Tsukruk. 2007. Hydrogel-encapsulated microfabricated haircells mimicking fish cupula neuromast. *Advanced Materials*, 19: 2903-2909
- Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of populations structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Pritchard, J.K. 2007. Documentation for STRUCTURE software: Version 2.3.3 http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/release_versions/v2.3.3/structure_doc.pdf

- Protas, E. M., C. Hersey, D. Kochanek, Y. Zhou, H. Wilkens, W.R. Jeffery, L.I. Zon, R. Borowsky y C. Tabin. 2006. Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics*, 38(1): 107-111.
- Raymond, M. y F. Rousset. 2001. GENEPOP (version 4.0) update version described in: populations genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rico-Mora, R. 1984. Contribución al conocimiento de la biología de *Astyanax fasciatus mexicanus* (Filippi) (Pisces: Characinidea) en la presa Zicuiran, La Huacana, Mich. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México. 53 p.
- Rosenberg, N.A. 2004. Distruct: a program for graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138.
- Sadoglu, P. 1956. A preliminary report on the genetics of the Mexican cave characins. *Copeia*, 2: 113-114.
- Saitpu, N y M. Nei. 1987. The Neighbour-Joining method. A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York.
- Schmitter-Soto J.J, M.E. Valdez-Moreno, R. Rodiles-Hernández y A.A. González-Díaz. 2008. *Astyanax arandoi*, a Junior Synonym of *Astyanax aeneus* (Teleostei: Characidae). *Copeia*, 409-413.
- Sharma, P.C., A. Grover y G. Kahl. 2007. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology*, 25: 490-498.
- Spruell, P., A.R. Hemmingsen, P.J. Howell, N. Kanda y F.W. Allendorf. 2003. Conservations genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 4: 17-29
- Strecker, U. 2003. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. *Molecular Ecology Notes* 3:150-151.
- Strecker, U., L. Bernatchez y H. Wilkens. 2003 Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in México (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, 12: 699-710.

- Strecker, U., V.H. Faúndez y H. Wilkens. 2004. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33(2): 469-481
- Strickler, A.G., Y. Yamamoto y W.R. Jeffery. 2007. The lens control cell survival in the retina: evidence from the blind cave fish *Astyanax*. *Development Biology*, 311(2): 512-523.
- Tautz, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. P 21-28. En S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen y A.J. Jeffreys. *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhäuser.
- Toth, G., Z. Gaspari y J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eucaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Valdez.-Moreno, M.E. 1997. Estudio comparativo osteológico de las formas oculadas actuales del género *Astyanax* en diversas cuencas de México. Tesis de Maestría. UNAM. 139 pp.
- Valdez-Moreno, M.E. 2005. A checklist of the freshwater ichthyofauna from El Peten and Alta Varapaz, Guatemala, with notes for its conservation and management. *Zootaxa*, 43-60 .
- Van Oosterhout C.V., W.F. Hutchinson, D.M.P. Wills y P. Shiolley. 2004. MICRO_CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Wang, I.J. y K. Summers. 2010, Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular ecology*, 19: 447-458.
- Waples, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *The American Genetic Association*, 89: 438-450.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimation F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wiley, S. y R.W. Mitchell. 1971. A bibliography of the Mexican eyeless characin fishes of the genus *Astyanax*. P 231-239. En: Reddell, J.R. and R.W. Mitchell (eds) *Studies on the cavernicole fauna of México*. Assoc. Mexican Cave Studies Bull.4:1-239.

- Wilkens, H y U. Strecker. 2003. Convergent evolution of the cavefish *Astyanax* (Characidae, Teleostei): genetic evidence from reduced eye-size and pigmentation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 80(4): 545-554.
- Wilkens, H. 1971. Genetic interpretation of regressive evolutionary process: Studies of hybrid eyes of two *Astyanax* cave populations (Characidae, Pisces). *Evolution* 25: 530–544.
- Wilkens, H. 1987. Genetic analysis of evolutionary process. *Int. J. Speleol.* 16: 33-88
- Wright, S. 1978. Evolution and genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Yamamoto, Y. y W.R. Jeffery. 2000. Central role for the lens in cavefish eye degeneration. *Science*, 289: 631–633.
- Yokoyama, R., y S. Yokoyama. 1990. Convergent evolution of the red- and green-like visual pigment genes in fish, *Astyanax fasciatus*, and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 9315–9318.

11. ANEXOS

ANEXO I. Versión modificada del protocolo de extracción fenol-cloroformo y visualización de ADN en geles de Agarosa 1%.

- a) Picar finamente el tejido y colocar el tubos ependorff rotulados de 1.5 ml.
- b) Agregar 10µl de SDS, 480µl de buffer de extracción y 10µl de Proteinasa K.
- c) Poner los tubos en un termoblock a 50°C y dejar digiriendo por al menos 3 horas o toda la noche
- d) Agregar 10 µl de NaCl a 5M y agitar con vortex por 15 segundos. Centrifugar a 14000 rpm por 5min y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- e) Añadir 350µl de Cloroformo-Alcohol Isoamilico (24:1), agitar en vortex por 15 segundos y centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos. Colocar el sobrenadante en un nuevo tubo. Repetir este paso.
- f) Agregar 500µl alcohol absoluto y dejar precipitar el congelador a -20°C por un minino de 4 horas, pero se recomienda dejar toda la noche. Posteriormente centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos.
- g) Decantar el alcohol con cuidado de no tirar el pellet que se formo y añadir 500µl de alcohol al 70% y dejar precipitar en el congelador a -20°C por 1 hora.
- h) Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos y decantar el alcohol, dejar que este se evapore a temperatura ambiente y resuspender el DNA en 50µl-100µl de Agua miliQ.
- i) Verificar la extracción de ADN en geles de agarosa al 1%.



Figura 1. Visualización de extracción de ADN total en gel de agarosa al 1 %.

ANEXO II. Tinción en plata para geles de acrilamida y visualización.

- a) Colocar el vidrio que tiene el gel pegado en una charola de acrílico y verter la solución fijadora (Alcohol-Acido acético). Dejar por 5 minutos y regresar la solución a su envase.
- b) Posteriormente verter la solución impregnante de plata (AgNO_3) por un periodo de 6 a 7 minutos y de nuevo regresarla a su envase.
- c) Lavar con 500ml de agua destilada por 10 segundos para eliminar el exceso de plata.
- d) Verter la solución reveladora (NaOH-Formaldehído) dejando transcurrir de 5 a 10 minutos y regresar la solución a su envase.
- e) Añadir la solución stop (Alcohol-Acido acético) por 2 minutos y regresar a su envase.
- f) Finalmente lavar con agua destilada y dejar secar el gel.

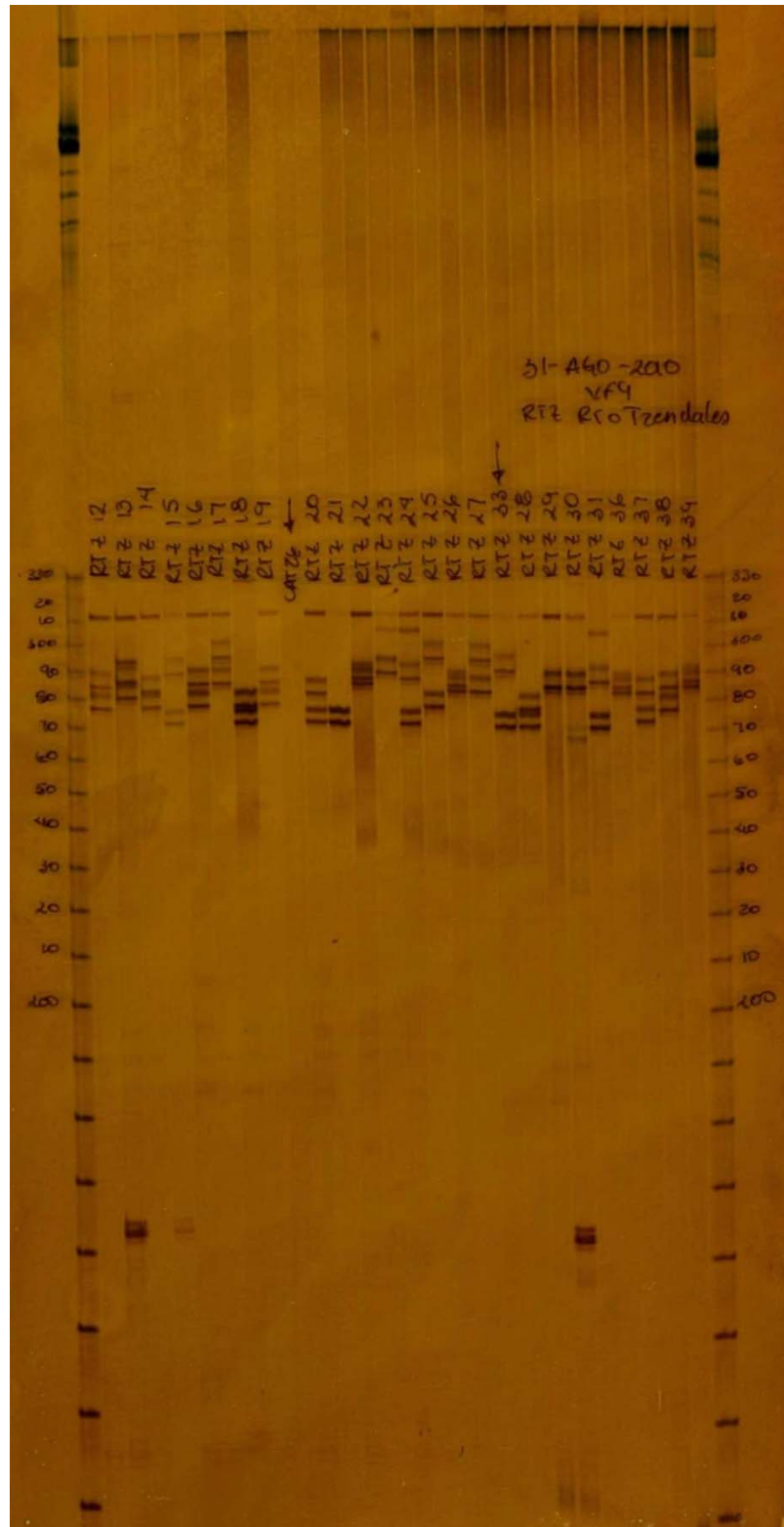


Figura 2. Gel de acrilamida teñido con plata para la visualización de los alelos, que en este caso corresponden a la localidad de Río Tezendales para el locus V-f9.

ANEXO III. Tabla I. Características morfológicas usadas para la identificación de individuos en las distintas localidades de muestreo.

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
CC1	12	13	23	33	7	5	6	5
CC2	12	14	23	s/escam				
CC3	12	14	24	35	6	3-5	6	3-5
CC4	12	14	22	35				
CC5	12	14	23	32	8	5	2(tirados)	5
CC6	11	13	22	37				
CC7	11	14	25	37	8	3-5	6	3-5
CC8	9	14	24	38				
CC9	12	13	22	36				
CC10	12	12	23	34				
CC11	11	13	21	34				
CC12	11	10	21	s/escam				
CC13	11	14	22	35				
CC14	11	10	22	34				
CC15	12	11	21	34				
CC16	12	13	21	36				
CC17	11	14	22	36				
CC18	11	12	22	37				
CC19	11	11	22	37				
CC20	11	13	23	35				
SF1	11	13	23	36	7	5-7	6	5
SF2	11	12	22	34				
SF3	11	13	20	36	7	5	7	3-5
SF4	10	12	19	34				
SF5	10	12	21	35				
SF6	11	13	22	35	7	5	7	5
SF7	10	12	22	34				
SF8	10	12	23	35				
SF9	10	12	23	34				
SF10	10	12	20	34				
SF11	10	12	21	33				
SF12	11	13	21	35				
SF13	11	12	21	35				
SF14	10	12	20	35				
SF15	10	13	22	35				
SF16	10	13	21	34				
SF17	10	12	24	34				
SF18	10	12	24	36				

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
SF19	11	11	21	35				
SF20	10	12	22	35				
SF21	10	11	21	33				
SF22	11	12	21	34				
SF23	10	13	24	34				
SF24	10	13	22	33				
SF25	11	12	20	34	7	3-5	7	5
SF26	11	12	23	35				
SF27	11	12	22	35				
SF28	10	12	24	34				
SF29	10	12	22	34				
SF30	NO	12	22	s/escam				
TR1	12	12	2	36				
TR2	12	12	21	36				
TR3	12	14	22	36				
TR4	12	12	22	36				
TR5	11	13	22	36				
TR6	12	13	20	36				
TR7	11	11	21	35				
TR8	12	12	22	36	7	5	7	5
TR9	12	12	22	33	6	5	6	5
TR10	12	12	2	36				
TR11	12	13	20	36				
TR12	12	14	23	36				
TR13	12	12	21	36				
TR14	12	12	22	36				
TR15	12	12	22	35				
TR16	12	12	22	35				
TR17	12	12	22	36				
TR18	12	12	23	35				
TR19	12	14	22	36				
TR20	12	13	20	36				
TR21	12	13	19	38				
TR22	13	13	22	36				
TR23	12	11	20	35				
TR24	12	13	20	36	7	5	6	3-5
TR25	12	12	s/aleta	36				
TR26	12	13	21	36				
TR27	12	12	21	35				
TR28	12	12	22	36				
TR29	11	13	s/aleta	36				

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta. Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
TR30	11	12	22	36				
TR31	12	12	22	35				
TR32	12	12	21	35				
TR33	12	13	21	36				
TR34	12	13	22	35				
TR35	11	12	22	36				
TR36	12	12	22	34				
TR37	12	12	23	36	8	5	7	5
TR38	11	12	21	34				
TR39	12	12	23	34				
TR40	11	12	20	35				
SLP1	11	14	20	34	7	3-5	7	5-7
SLP2	12	13	23	35	7	3-5	7	5
SLP3	12	14	21	34				
SLP4	11	13	cortada	27*				
SLP5	12	13	20	34				
SLP6	11	13	22	35	7	5	7	3-5
SLP7	11	13	20	34				
SLP8	12	12	23	33				
SLP9	12	13	21	32				
SLP10	12	13	23	32				
SLP11	11	13	21	32				
SLP12	rota	14	cortada	27*				
SLP13	11	13	21	35				
SLP14	12	12	20	29	7	5	7	3-5
SLP15	12	13	22	33				
SLP16	12	12	23	32				
SLP17	rota	12	22	36				
SLP18	rota	14	20	34				
SLP19	12	14	20	29*				
SLP20	12	11	23	34				
LCA1	11	12	20	35				
LCA2	12	13	21	34				
LCA3	12	13	19	37				
LCA4	11	12	22	37	8	5	7	5
LCA5	11	13	21	36				
LCA6	12	13	22	36				
LCA7	12	11	20	33				
LCA8	12	13	23	35	7	5	7	5
LCA9	12	12	22	35				

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta. Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
LCA10	11	14	20	35	7	5	7	5-7
LCA11	11	13	22	34				
LCA12	12	12	21	35				
LCA13	12	14	20	34				
LCA14	11	12	21	34				
LCA15	11	12	22	33				
LCA16	12	12	22	33				
LCA17	11	13	20	35				
LCA18	11	13	21	33	8	5	8	5
LCA19	12	12	23	34				
LCA20	11	11	23	s/escam				
LCA21	11	11	21	35				
LCA22	11	13	21	s/escam				
LCA23	10	12	22	35				
LCA24	11	11	24	s/escam				
LCA25	12	14	21	s/escam				
LCA26	12	11	20	s/escam				
CAT1	15	15	24	38	4(tirados)	5-7	3(tirados)	7
CAT2	15	14	22	35	10	5	8	7
CAT3	17	13	25	37	10	5	6	7-9
CAT4	15	14	28	37	11	5	8	7-9
CAT5	16	15	28	38	11	5	7	5-7
CAT6	16	14	26	37	9	5-7	7	5-7
CAT7	16	14	28	37	10	5	7	5-9
CAT8	16	14	22	35	10	5	7	5-7
CAT9	16	14	26	36	tirados	----	3(tirados)	5-7
CAT10	12	14	25	36	10	5	6	5-7
CAT11	16	14	24	37	11	5-7	8	5-7
CAT12	15	14	25	38	10	5	7	5-7
CAT13	16	14	27	37	10	5-7	6	7
CAT14	17	14	24	36	8	5	7	7
CAT15	15	15	27	37	10	5	7	7
CAT16	15	14	26	35	9	5-7	6	7
CAT17	15	15	24	37	11	5	6	5
CAT18	17	15	26	37	10	5	7	7
CAT19	15	14	27	37	11	5	6	7
CAT20	16	14	27	37	11	5	6	5-7
CAT21	13	13	25	35	7	5	7	5-7
CAT22	17	15	25	37	11	5-7	6	7
CAT23	16	15	25	37	10	5	6	5-7
CAT24	16	14	26	37	5(tirados)	5	7	5-7

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta. Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
CAT25	14	14	24	34	11	5	6	5-7
CAT26	17	14	26	33	9	5	6	5
TA1	14	15	27	37	5(tirados)	5	3(tirados)	5
TA2	13	13	28	36				
TA3	14	12	26	36				
TA4	13	13	26	36	8	5	8	5
TA5	14	12	26	s/escam				
TA6	13	12	24	s/escam				
TA7	13	12	26	34				
TA8	13	12	26	s/escam				
TA9	14	12	24	s/escam				
TA10	13	12	26	33				
TA11	13	12	26	s/escam				
TA12	12	12	25	s/escam				
TA13	13	12	26	34				
TA14	13	12	26	s/escam				
TA15	14	14	26	36	8	5	8	5-7
TA16	14	12	28	33				
TA17	12	12	26	36				
TA18	14	12	25	s/escam				
TA19	13	12	24	32				
TA20	13	12	24	32				
TA21	12	12	26	34				
TA22	13	12	26	34				
TA23	13	12	26	35				
TA24	13	12	26	36				
TA25	13	13	28	35				
TA26	12	13	26	35				
TA27	14	13	26	36	4(tirados)	5	3(tirados)	5
TE1	14	13	25	36				
TE2	14	13	25	35				
TE3	13	13	24	36				
TE4	12	12	25	36				
TE5	14	12	28	36				
TE6	13	12	25	35	7	3-5	7	5
TE7	12	12	26	36				
TE8	13	12	25	36				
TE9	12	13	25	36				
TE10	13	12	26	37	8	5	7	5-7
TE11	13	13	25	37				

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta. Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
TE12	13	13	28	36				
TE13	13	12	25	35				
TE14	13	12	24	36				
TE15	13	12	25	36				
TE16	14	12	26	38				
TE17	13	12	26	37				
TE18	13	12	24	37				
TE19	13	12	25	36				
TE20	13	12	24	34	7	5	7	5-7
TE21	11	12	26	36				
TE22	14	12	27	37				
TE23	13	12	25	36				
TE24	13	12	28	36				
TE25	13	15	26	36				
TE26	13	12	25	37				
TE27	13	12	26	35				
TE28	13	12	26	35				
TE29	12	13	25	36	7	5	7	5
TE30	12	12	26	37				
TE31	13	13	28	37				
TE32	13	12	28	37				
TE33	12	12	25	36				
TE34	13	11	25	35				
TE35	13	12	26	37				
TE36	13	12	26	36				
TE37	13	12	25	35				
TE38	13	12	26	34				
TE39	13	12	28	36				
TE40	14	12	26	38				
TE41	13	12	27	34				
TE42	13	12	25	37				
TE43	14	13	26	35				
TE44	13	12	26	37				
TE45	13	12	25	36				
TE46	13	13	26	36				
TE47	13	12	23	36				
TE48	12	13	24	36				
TE49	13	13	24	35				
TE50	13	12	26	36				
RTZ1	11	12	24	36				
RTZ2	12	13	25	36				

Individuo	Branq. Inferior.	Aleta Pectoral.	Aleta. Anal	Linea Lateral	No. D. Max	Cúspides D. Max	No. D. Mand.	Cuspides D. Mand.
RTZ3	11	12	25	35	7	5	7	5
RTZ4	13	13	25	37				
RTZ5	12	12	25	36	5(tirados)	5	7	5
RTZ6	13	13	25	35				
RTZ7	11	12	26	35				
RTZ8	13	13	26	38	7	5	7	3-5
RTZ9	14	12	25	34				
RTZ10	13	14	26	36	8	5	7	3-5
RTZ11	13	13	26	36				
RTZ12	13	14	25	37				
RTZ13	12	12	26	37				
RTZ14	11	13	26	s/escam				
RTZ15	14	12	25	s/escam				
RTZ16	13	14	25	35				
RTZ17	13	14	22	35				
RTZ18	13	13	24	35				
RTZ19	12	13	25	36				
RTZ20	13	14	26	36				
RTZ21	13	13	25	34				
RTZ22	13	14	24	34				
RTZ23	14	12	23	33				
RTZ24	13	13	24	36				
RTZ25	13	13	25	33				
RTZ26	13	13	26	34				
RTZ27	13	12	21	36				
RTZ28	13	13	26	s/escam				
RTZ29	11	13	24	35				
RTZ30	12	12	25	35				
RTZ31	13	13	26	s/escam				
RTZ32	13	13	26	36				
RTZ33	14	14	25	s/escam				
RTZ34	13	13	24	36				
RTZ35	13	13	26	s/escam				
RTZ36	12	14	26	36				
RTZ37	13	13	26	36				
RTZ38	12	14	24	36				
RTZ39	13	13	26	s/escam				
RTZ40	13	14	27	34				
RTZ41	12	13	24	s/escam				

ANEXO IV



Figura 3A. Dientes maxilares y mandibulares presentes en los individuos colectados en la localidad de Catemaco. Se observa que los dientes maxilares presentan de 5 a 7 cúspides, mientras que los mandibulares presentan 5 cúspides.



Figura 3B. Dientes maxilares y mandibulares presentes en individuos identificados como *Astyanax*. Se observa que los dientes maxilares y mandibulares presentan 5 cúspides.