

Informe final* del Proyecto H284

Estudio filogenético y taxonómico en especies endémicas del género Poblana De Buen (Pisces: Atherinidae)

Responsable:	Dr. Edmundo Díaz Pardo
Institución:	Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Zoología
Dirección:	Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Santo Tomás, México, DF, 11340 , México
Correo electrónico:	copemex@redipn.ipn.mx
Teléfono/Fax:	Tel 57 29 60 00 ext 62420 Fax: 5396 3503
Fecha de inicio:	Mayo 30, 1996
Fecha de término:	Diciembre 15, 1998
Palabras clave:	Taxonomía, especies endémicas, peces, antherinidae
Principales resultados:	Estudio de investigación, base de datos
Resumen:	

Los aterínidos americanos son organismos marinos y de agua dulce, cuyo origen se remonta al Mesozoico. Es un grupo ampliamente diversificado cuyas especies se agrupan en dos grandes subfamilias endémicas: Menidiinae constituida por siete géneros y Atherinopsinae con cuatro. El registro fósil de los aterínidos sugiere que su diversificación ocurrió entre el Plioceno tardío y el Pleistoceno temprano, asociada con eventos de tipo histórico, dicho proceso se ve reflejado en el número de especies y en la exclusividad de las mismas en la Mesa Central. El endemismo de los aterínidos está representado por 18 especies del género *Chirostoma* y cuatro especies de *Poblana*. El origen reciente de estos dos géneros, la sobreposición de sus áreas de distribución, la hibridación natural interespecífica e intergenérica de los aterínidos, ha hecho difícil establecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas de estos grupos, así como reconstruir su historia evolutiva. Los trabajos taxonómicos clásicos reconocen hoy en día que *Chirostoma* y *Poblana* son géneros bien definidos y estrechamente emparentados; sin embargo, otros autores mencionan que la variación de los caracteres morfológicos y el grado de sobreposición interespecífico e intergenérico que presentan los mismos, ponen en duda la validez taxonómica y filogenética de ambos géneros. Los resultados del presente trabajo muestran que cada uno de los taxones de *Poblana* se constituye como verdaderas unidades taxonómicas y que deberían ser consideradas unidades específicas. No obstante, también muestran que las diferencias entre *Poblana* y *Chirostoma* no sustentan su separación como géneros diferentes. Por ello, se hace necesaria una revisión taxonómica de ambos géneros que contemple el campo de variabilidad de estos taxones y determine si *Poblana* puede ser considerado un género distinto a *Chirostoma*. De esta situación se deriva que la hipótesis del gran lago Plio-Pleistocénico debe ser reconsiderada como marco de referencia para explicar la diferenciación y origen de las especies del género *Poblana* y *Chirostoma* a partir de un ancestro común.

* El presente documento es un informe final que no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx

INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto: **ESTUDIO FILOGENÉTICO Y TAXONÓMICO EN ESPECIES ENDEMICAS DEL GÉNERO *Poblana* De Buen (Pisces: Atherinidae)**

Proyecto H284

Institución: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
Departamento: Zoología
Dirección: Carpio y Plan de Ayala, Casco de Sto. Tomás. CP. 11340
Teléfono y FAX: 729 6300 ext. 62420

Área: Conocimiento Taxonómico, Zoológico, Acuático

Región: Cuenca del Oriental, Edo. de Puebla

Especies de interés: *Poblana alchichica squamata*, *P. a. alchichica*, *P. letholepis* y *P. ferdebueni* (Atherinidae:Meniddinae) (NOM 059-Ecol-1994).

Dr. Edmundo Díaz Pardo
Director del Proyecto

INVESTIGADORES PARTICIPANTES

Dr. Edmundo Díaz Pardo. Responsable del Proyecto

M. en C. Gerardo Zúñiga Bermúdez. ENCB-IPN

Dra. Lourdes Muñoz Moreno. CINVESTAV-IPN

Biol. Yolanda Salinas Moreno. ENCB-IPN

Biol. Maria Teresa Vega Ramírez. Sección de Graduados ENCB-IPN

Biól. Beatriz Adriana Coyote Hidalgo. ENCB-IPN

CONTENIDO

I. RESUMEN

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. OBJETIVO GENERAL

IV. MATERIAL Y METODOS

V. RESULTADOS

VI DISCUSION Y CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA CITADA

ANEXO

I. RESUMEN

Los aterínidos americanos son organismos marinos y de agua dulce, cuyo origen se remonta al Mesozoico. Es un grupo ampliamente diversificado cuyas especies se agrupan en dos grandes subfamilias endémicas: *Menidiinae* constituida por siete géneros y *Atherinopsinae* con cuatro.

El registro fósil de los aterínidos sugiere que su diversificación ocurrió entre el Plioceno tardío y el Pleistoceno temprano, asociada con eventos de tipo histórico, dicho proceso se ve reflejado en el número de especies y en la exclusividad de las mismas en la Mesa Central. El endemismo de los aterínidos está representado por 18 especies del género *Chirostoma* y cuatro especies de *Poblana*.

El origen reciente de estos dos géneros, la sobreposición de sus áreas de distribución, la hibridación natural interespecífica entre algunas especies de *Chirostoma* y la escasa diferenciación morfológica interespecífica e intergenérica de los aterínidos, ha hecho difícil establecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas de estos grupos, así como reconstruir su historia evolutiva.

Los trabajos taxonómicos clásicos reconocen hoy en día que *Chirostoma* y *Poblana* son géneros bien definidos y estrechamente emparentados; sin embargo, otros autores mencionan que la variación de los caracteres morfológicos y el grado de sobreposición interespecífico e intergenérico que presentan los mismos, ponen en duda la validez taxonómica y filogenética de ambos géneros.

Los resultados del presente trabajo muestran que cada uno de los taxones de *Poblana* se constituyen como verdaderas unidades taxonómicas y que deberían ser consideradas unidades específicas. No obstante, también muestran que las diferencias entre *Poblana* y *Chirostoma* no sustentan su separación como géneros diferentes.

Por ello, se hace necesaria una revisión taxonómica de ambos géneros que contemple el campo de variabilidad de estos taxones y determine si *Poblana* puede ser considerado un género distinto a *Chirostoma*. De esta situación se deriva que la hipótesis del gran lago Plio-Pleistocénico debe ser reconsiderada como marco de referencia para explicar la diferenciación y origen de las especies del género *Poblana* y *Chirostoma* a partir de un ancestro común.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diversificación de los aterínidos y de otros grupos de peces epicontinentales en la Mesa Central de México aparentemente se encuentra asociada con procesos de tipo histórico, que se refleja en el número de especies y en su endemismo (Smith et al 1975). El endemismo de los aterínidos en esta región está representado por 18 especies del género *Chirostoma* y cuatro del género *Poblana* (Miller 1966, Miller y Smith 1986).

El grado de endemismo de los géneros presentes en la Mesa Central, varía desde la presencia de algunas especies en toda la región, hasta su exclusividad en un solo cuerpo de agua, tal es el caso extremo de los taxones que componen al género *Poblana* presentes en los lagos cráter de la Cuenca del Oriental, Puebla.

En esta región ocurren conos cilíndricos o cráteres conteniendo pequeños lagos conocidos como "axalapascos", los cuales se mantienen por el flujo subterráneo de los mantos acuíferos de la cuenca y la precipitación pluvial directa (Reyes 1979, Gasca-Durán 1981). Estos cuerpos de agua varían tanto en sus dimensiones de profundidad como de extensión y presentan características fisicoquímicas, limnológicas y de diversidad biológica particulares (Arredondo et al 1983, Ramírez-García y Novelo 1984).

Sobre el origen de estos peces en los lagos cráter, el doctor Alvarez sustenta la hipótesis de la existencia de un gran lago Plio-Pleistocénico en el área de la Mesa Central, en donde habitaba el ancestro de los géneros *Chirostoma* y *Poblana*.

Las pruebas geológicas e hidrográficas sugieren que el gran lago estaba inmerso en la Cuenca de México, la cual mantenía conexión fluvial y lacustre con las cuencas endorreicas del Oriental a través de la región de los Llanos de Apam y de Puebla. Además, mantenían conexión con la cuenca del Balsas (Barbour 1973).

Alvarez (1950) infiere que tras la inundación de los cráteres de los Llanos de Puebla, ocurrió la invasión faunística de los aterínidos marinos, de modo que debió de haber existido una época en que todas las masas acuáticas ahora aisladas o desaparecidas, tuvieron la misma fauna. Como resultado de diversos procesos de vulcanismo, geológicos y orográficos este escenario se modificó drásticamente, a tal grado, que la conexión entre las cuencas se perdió y el paisaje interno de cada una de ellas se vió modificado por el surgimiento de nuevos elementos dentro de ellas. En la

Cuenca del Oriental, como resultado de implosiones se forman conos cineríticos o lagos cráter que, según la hipótesis del Dr. Alvarez, forman parte muy importante del proceso de divergencia del ancestro de los géneros *Chirostoma* y *Poblana*.

Con el descenso de los niveles de agua, a través de los años, emergieron los bordes de los cráteres, determinando de esta manera el aislamiento de sus aguas y de la ictiofauna presente en ellos. A medida que la desecación continuó, el gran lago disminuyó su nivel, a tal grado, que quedó circunscrito a pequeñas áreas lacustres y lagos cráter, que son alimentados principalmente por aguas freáticas.

La altura que presentan en la actualidad los axalapascos o lagos cráter sugieren que su aislamiento, al disminuir el nivel de agua del gran lago, fue diferencial. Así, se sugiere, que La Preciosa, cuya altitud mínima de borde esta por encima de los 2400 m fue el "primero" en quedar aislado, siguiendo Alchichica y Quechulac, respectivamente. El aislamiento de distintas partes de la población del ancestro de ambos géneros, promovió su diferenciación en los géneros *Chirostoma* y *Poblana* como resultado del proceso de deriva génica y selección natural al interrumpirse la cohesión de esta gran población del ancestro por aislamiento.

Bajo estas consideraciones, Alvarez (1950) establece que los Lagos del grupo Techachalco tienen cada uno de ellos una especie o forma distinta de *Poblana*. Así la Laguna de Quechulac sustenta a *Poblana alchichica squamata*, La Preciosa a *Poblana letholepis*, Alchichica a *Poblana alchichica alchichica* y Atexcac carece de ictiofauna. Posteriormente en 1965, Solórzano describe una especie más del género *Poblana*, endémica del manantial de Chignahuapan, Pue. a la que denomina *Poblana ferdebueni* (Solórzano 1965).

Mientras que el género *Poblana* es endémico de los axalapascos de los Llanos de Puebla, la distribución de *Chirostoma* es más amplia, comprendiendo lagunas situadas en las Cuencas del Oriental, la de México, la del Lerma, alcanzando su límite norte en los ríos del Estado de Durango.

La estrecha relación que guardan *Chirostoma* y *Poblana* puede ser sólo entendida a través del reconocimiento de su origen común y del proceso de diversificación paralelo que han sufrido. De esta manera, Alvarez (1950, 1972) plantea que estos géneros están estrechamente emparentados debido a que comparten un origen y un ancestro común (Echelle y Echelle 1984).

El origen reciente de los géneros *Chirostoma* y *Poblana* (Miller 1966; Barbour 1973; Smith et al 1975; Echelle y Echelle 1984), el solapamiento de sus áreas de distribución (Barbour 1973), la hibridación natural interespecífica entre algunas especies del género *Chirostoma* (Barbour y Chernoff 1984) y la escasa diferenciación morfológica interespecífica e intergenérica de los aterínidos (Alvarez 1950, Barbour y Chernoff 1984, Echelle-Echelle 1984, Guerra-Magaña 1986, Polaco y Guzmán 1992), ha hecho difícil establecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas de estos grupos, así como reconstruir su historia evolutiva.

A pesar, de que los trabajos taxonómicos clásicos reconocen hoy en día que tanto *Chirostoma* como *Poblana* son géneros bien definidos y estrechamente emparentados (De Buen 1945, Alvarez 1950; 1972, Guerra-Magaña 1986), su definición intergenérica e interespecífica es compleja (Polaco y Guzmán 1992). En este sentido, las características morfológicas más usadas para la diagnosis de *Poblana*, las cuales son también las más utilizadas en el diagnóstico de *Chirostoma*, presentan un fuerte solapamiento, de tal forma, que ha conducido a diferentes autores a plantear que se trata de un mismo género.

Así, Barbour (1973), con base en el análisis de caracteres morfológicos, considera que la taxonomía de *Chirostoma* es compleja e incluso sugiere que *Poblana* debe caer en sinonimia con *Chirostoma*. En este mismo sentido, Polaco y Guzmán (1992) establecen que es muy difícil separar ambos géneros, utilizando solamente los caracteres morfológicos en trabajos taxonómicos tradicionales.

Guerra-Magaña (1986) establece, a partir de un análisis cuantitativo de 18 caracteres morfológicos entre las especies del género *Poblana* y poblaciones de *Chirostoma jordani* presentan una clara diferenciación a nivel genérico de ambos taxa. Así mismo, encuentra ligeras diferencias entre las poblaciones de *Chirostoma jordani*, pero establece que estas diferencias no son suficientes como para considerarlas subespecies. Sin embargo, con respecto a las especies del género *Poblana*, menciona que las diferencias observadas en los peces de La Preciosa son suficientes y distintivas de las especies de *Poblana* presentes en Alchichica y Quechulac. También encuentra, que existe una gran semejanza morfológica entre los peces de La Preciosa y Quechulac, a tal grado, que las considera subespecies; a diferencia de lo que se pensaba.

Las relaciones taxonómicas y filogenéticas establecidas para el género *Chirostoma*, se basan tanto en la comparación morfológica de caracteres primitivos y derivados como en sus tendencias de remplazo (Barbour 1973).

Otra aproximación hecha para estudiar y analizar tanto la problemática del género *Chirostoma* como la de *Poblana* es la de Echelle y Echelle (1984), quienes sugieren que *Chirostoma* y *Poblana* tienen origen monofilético, cuyo ancestro fue muy parecido a *Menidia peninsulae*. Las relaciones taxonómicas y filogenéticas establecidas en este estudio entre las especies de estos géneros, se basan en un análisis de similitud genética obtenido a partir de las frecuencias de alelos que codifican para enzimas solubles.

La construcción de filogenias o cladogramas a partir de datos moleculares será de gran importancia para el reconocimiento de la historia evolutiva de los aterínidos de la Mesa Central, sin embargo, la importancia que reviste el impacto del hombre en estas cuencas, se ve reflejada en la disminución de la diversidad biológica.

En un contexto evolutivo, estos lagos han representado para las comunidades de peces hábitats cambiantes en espacio y tiempo, cuya transformación natural se ha visto en muchos casos, afectada por diversos factores externos ocasionando su degradación y la subsecuente extinción de muchas especies que en ellos habitan.

A diferencia de lo que sucede con otros hábitats naturales y las especies asociadas a ellos, los lagos y los peces han recibido escaso interés en los programas de conservación. Las razones de esta actitud se sustentan en que los lagos han sido considerados solo como reservorios de agua, y los peces vistos como un recurso alimentario inagotable de fácil explotación para el hombre.

A pesar de que estos lagos tienen su origen en el pleistoceno, han jugado un papel importante en los ciclos hidrológicos de precipitación, drenaje y evapotranspiración en las regiones en donde se localizan, y también han sido sitios excepcionales donde la biodiversidad se ha manifestado a través del proceso evolutivo.

Afortunadamente, en las dos últimas décadas, diversas organizaciones internacionales han hecho hincapié en la necesidad de conservar los lagos y en reconocer la enorme importancia que tienen las comunidades de especies nativas como parte de la diversidad mundial.

En la actualidad, las cuatro especies que componen al género *Poblana*, han sido jerarquizadas en la categoría de amenazadas, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 059-Ecol-1994), que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestre, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, para las que establece especificaciones para su protección.

Las razones que han llevado al género en su conjunto a una situación que podría calificarse como crítica son por un lado, el manejo que se ha hecho de su hábitat natural en el cual se han introducido tanto especies competidoras como depredadoras, tal es el caso de la introducción de diferentes especies de pecílidos en la laguna de Chignahuapan, así como de trucha en las lagunas de Quechulac, La Preciosa y Chignahuapan con propósitos de explotación comercial, y por otro lado el impacto causado por los programas de desazolve sin protección de la fauna nativa de la laguna de Chignahuapan.

De acuerdo a lo anterior la ictiofauna de dichos lagos cráter merece ser estudiada por su reducido número de especies, su estrecha distribución que restringe a cada una de ellas a un sólo cuerpo de agua, por pertenecer a linajes que aparentemente son resultado de un aislamiento geográfico, y por su semejanza morfológica. De la misma forma, porque el impacto ambiental en estos cuerpos de agua pone en grave riesgo la existencia de estos taxa, aún antes de que se haya completado su conocimiento biológico.

III.OBJETIVO

GENERAL

Establecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas de los diferentes taxones del género *Poblana* mediante marcadores moleculares.

PARTICULARES

- 1) Establecer las relaciones taxonómicas entre las poblaciones del género *Poblana*.
- 2) Determinar si las poblaciones del género *Poblana* son un grupo taxonómico diferente al género *Chirostoma*.

3) Establecer el o los probables ordenamientos filogenéticos a partir de los datos moleculares.

4) Determinar el grado de relación evolutiva y filogenética entre los géneros de *Poblana* y *Chirostoma*.

IV. MÉTODO

Colecta de organismos. Entre 1996 y 1997 se colectaron 50 organismos de cada una de las siguientes especies: *Chirostoma riojai* del embalse Ignacio Ramírez, Edo. de México, *Chirostoma jordani* de la presa Ignacio Allende, Edo. de Guanajuato, *Chirostoma arge* del Río Laja, Edo de Guanajuato, *Chirostoma consocium*, del Río Tepehuaje, Edo. de Jalisco; Asimismo se colectaron 15 ejemplares de los siguientes taxones: *Poblana alchichica alchichica* del lago cráter de Alchichica, Edo. de Puebla, *P. a. squamata*, del cráter de Quechulac, Edo. de Puebla, *P. letholepis* del cráter de La Preciosa, Edo. de Puebla y 5 individuos de *Algansea* del Lago de Pátzcuaro, Edo. de Michoacán. Dos viajes de colecta fueron realizados a la laguna de Chignahuapan para colectar a *Poblana ferdebueni*, pero debido al grado de deterioro en que se encuentra este cuerpo de agua no fue posible contar con ejemplares de esta especie.

Los organismos fueron capturados empleando chinchorros de 3 mts. de longitud y malla fina. Una muestra de 20 individuos adultos de cada especie se congeló y almacenó a -70 °C en nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio y posterior análisis por la técnica de RAPD, solo 3 organismos del grupo externo *Algansea* fueron empleados en el estudio. Los ejemplares restantes de cada especie se fijaron en formaldehído al 10% para su determinación taxonómica.

Determinación taxonómica de las especies. Partiendo del antecedente de que un taxón de aterínidos es exclusivo y endémico de cada una de las lagunas de Alchichica, Quechulac y la Preciosa no fue necesario destinar ejemplares de estos lagos para su determinación. En el caso del, material del embalse Ignacio Ramírez, Edo. de Méx.; de la presa Ignacio Allende, Gto., del Río Laja, Gto. y Río Tepehuaje, Jal., se utilizaron tres ejemplares de cada lugar para su determinación taxonómica.

Extracción y purificación de DNA. Siguiendo la técnica modificada de Pendleton y col. (1993), se homogeneizaron 25 mg de tejido en 700 µl de amortiguador de lisis (EDTA 100 mM, SDS 0.5%, Tris-HCl 10 mM -pH 8.0-, NaCl 100 mM y proteinasa K 100 ng/ml), incubándose durante 6-15 horas a 50 °C. Se realizó una extracción

sucesiva con fenol 1:1 (v/v), centrifugando a 15000 x g durante 5 minutos a 22 °C. Una extracción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), centrifugando a 15000 x g durante 5 minutos a 22 °C. Y una extracción final con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), centrifugando a 15000 x g durante 5 minutos a 22 °C. Por último se realizó una diálisis por 24 h en TE (Tris-HCl 10 mM -pH 8.0, EDTA 1 mM), a 4 °C.

Determinación de la concentración de ácidos nucleicos. El DNA de las diferentes muestras fue cuantificado por espectrofotometría de luz UV a 260 nm, en un espectro Gene Quant 2 Pharmacia.

Selección de Oligonucleótidos ("primers"). Se realizó un tamizaje a partir de un banco de 40 "primers", basados en su respuesta de amplificación y variabilidad en las bandas.

Amplificación del DNA. Para la amplificación de DNA se siguió la técnica de Black y DuTeau (1997) a la cual se le hicieron ciertas modificaciones. La técnica utiliza una concentración de DNA por mezcla de reacción de 25 a 50 ng, 2.5 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, Perkin Elmer), 2 U de taq Polimerasa (Perkin-Elmer), 200 ng de "primer" (Life-Technologies y Bio-Synthesis) y 3 µl de amortiguador 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.0, MgCl₂ 15 mM, gelatina 0.1%), todo esto llevado a un volumen final de 30 µl con agua bidestilada desionizada y ultrapura (esterilizada y filtrada en membranas de 0.22 µm) mas una gota de aceite mineral.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 480 con el siguiente programa:

45 ciclos de

- a) Fase de desnaturalización, 1 minuto a 92 °C;
- b) Fase de reconocimiento, 1 minuto a 36 °C;
- c) Fase de extensión, 2 minutos a 72 °C.

Extensión final 7 minutos a 72 °C.

Electroforesis Los productos de la amplificación fueron evidenciados mediante corrimientos en geles de agarosa al 1.2%, utilizando como amortiguador TAE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, ácido acético glacial) y Bromuro de Etidio 10 mg/ml a 70 volts. Se emplearon como marcadores moleculares el Ø X174 (1353, 1078, 872, 603,

310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bases) y pUC-19 (2686, 1975, 1568, 1118, 910, 692, 540, 426, 409, 235, 166, 19 bases).

Visualización de las bandas (marcadores moleculares) Los geles impregnados en bromuro de etidio se expusieron a luz UV y finalmente se analizaron y fotografiaron con ayuda del analizador de imágenes Fotodyne mod. 414(379-7000) y el programa Collage Analysis.

Análisis de Datos. Para el presente estudio se consideró a cada uno de los individuos como una muestra independiente no asociada directamente a una especie, con el fin de apreciar, sin un sesgo *a priori*, el ordenamiento de las muestras. Asimismo de acuerdo con la metodología inicial se incorporó a *Algansea* como grupo externo.

A partir de las fotografías de los geles y considerando el patrón de bandeo por individuo para cada "primer", se construyeron tablas de datos de presencia/ausencia. Para ello fue necesario previamente identificar y cuantificar el número de bandas por "primer" y el número de "primers" totales.

Los datos fueron analizados por medio de los programas NTSYS 2.0 y RAPD DISTANCE 1.08. Los índices de similitud de Jaccard, Dice, Kulczynski 1 y 2, Apostol, Russell y Rao fueron utilizados para llevar a cabo la conversión de los caracteres genéticos cualitativos a estimaciones de distancias genéticas.

La construcción de árboles se realizó por medio de los métodos UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages), WPGMA (Weighted pair-group method using arithmetic averages), Ligamiento completo (Furthest neighbour), y del vecino más cercano (Neighbor Joining), los cuales a partir de datos de distancia establecen la relación gráfica de los OTUs

Una medida del grado de adecuación entre la matriz de distancia original y el modelo de distancia obtenida después de la agrupación fue calculada. Un método basado sobre el coeficiente de correlación producto momento de Pearson fue llevado a cabo para comparar las matrices de distancia pre- y postagrupamiento. De tal forma, que el coeficiente de correlación cofenética resume la adecuación entre estas matrices y por consiguiente es una medida del grado de distorsión del árbol.

De manera conjunta, se realizó un análisis de ordenación por componentes principales, el cual permitió examinar la dispersión de las OTUs en un espacio de pocas dimensiones. Un árbol de tendido mínimo, el cual es una colección de líneas que muestran la relación entre los pares de puntos más cercanos, fue construido con

el propósito de reflejar la estructura y el grado de distorsión de los resultados del método ordenación. La representación gráfica final muestra la sobreposición del árbol de tendido mínimo sobre la configuración de las OTUs resultado del método de ordenación en un espacio tridimensional.

V. RESULTADOS

V.1. Extracción y cuantificación de DNA

La extracción y cuantificación de DNA se llevó a cabo en promedio para 15 ejemplares de cada una de las especies. La técnica de extracción de Pendetlon et al. (1993) y la diálisis posterior a que fueron sometidas las muestras de las especies de los géneros *Poblana*, *Chiostoma* y *Algansea* permitieron obtener muestras de DNA abundantes y de excelente calidad (Tabla 1-8). La incorporación de la diálisis a este protocolo es una modificación técnica hecha por nuestro grupo de trabajo que mejora la calidad del DNA de los peces.

V.2. Selección de Oligonucleótidos y . Amplificación de DNA

De un total de cuarenta "primers" ensayados, doce de ellos mostraron ser consistentes entre las especies, reproducibles y tener un patrón de bandeo claramente definido (Tabla 9). Sobre la muestra total de 73 organismos se realizaron aproximadamente 1100 amplificaciones incluyendo organismos de las diferentes especies y el marcador de peso molecular conocido (Fig. 1-6). En este cálculo se incluyen aquellas repeticiones que tuvieron que realizarse para el caso de amplificaciones imprecisas. Los doce "primers" ensayados generaron un total de 115 bandas polimórficas, las cuales varían de 2211 a 241 pares de base (bp), el número de bandas por primer vario 7 a 13 (Tabla 10).

V.3 Análisis específico y genérico de los patrones de bandeo por "primer"

A partir de los productos de la amplificación se reconoció un patrón diferente de bandeo para cada "primer" (Tabla 11-22). La caracterización de cada uno de estos patrones consideró el conteo del número de bandas por "primer" y la estimación del número de pares de bases aproximado para cada banda, con el fin de identificar cada

una de ellas. Una matriz de 115 marcadores por 73 OTUs fue construida para realizar los análisis estadísticos correspondientes (Tabla 23).

El análisis de la matriz original de datos a nivel intragenérico muestra que existen seis marcadores de especie para el género *Poblana*, tres de ellos exclusivos de *P. a. squamata*, dos de *P.a. alchichica* y uno de *P. letholepis* (Tabla 24). En el género *Chiostoma* sólo se presentan para estos "primers" tres marcadores que podrían diferenciar a dos de las cuatro especies analizadas: *C. riojai* por medio del "primer" 34, banda 904 y *C. arge* mediante los "primers" R37, banda 466 y R22, banda 1282 (Tabla 25). Intergenéricamente se encontraron siete marcadores genéricos, cinco permiten determinar al género *Algansea*, uno al género *Chiostoma* y uno al género *Poblana* (Tabla 26).

V.4 Análisis de Similitud

A pesar de que varias medidas de similitud han sido propuestas, muchas de ellas están correlacionadas unas con otras, al menos en el nivel conoespecífico. De tal forma que las diferencias entre ellas pueden resultar más de sus diferentes propiedades matemáticas que de diferencias de tipo biológico. Por ello, debido a que todos los índices mostraron un comportamiento semejante se eligió el de Jaccard, debido a que éste calcula las distancias basado en la presencia de las bandas que comparten los taxa, lo cual es más apropiado cuando se desean estimar relaciones taxonómicas y filogenéticas a partir de datos de presencia-ausencia. Los datos de distancia entre los individuos pertenecientes a una especie variaron de la siguiente manera: *P. letholepis* de 0.410 a 0.800, *P. a. alchichica* entre 0.484 y 0.949, *P. a. squamata* de 0.600 a 0.878, *C. jordani* de 0.534 a 0.868, *C. riojai* de 0.530 a 0.912, *C. arge* entre 0.522 y 0.8701, y *C. consocium* de 0.549 a 0.804.

V.5. Análisis de las relaciones Taxonómicas y Filogenéticas

Los métodos UPGMA, WPGMA y Ligamiento completo han sido utilizados en la construcción de árboles partiendo de la consideración de que la tasa sustitución de aminoácidos o nucleotídica es la misma para todos los linajes evolutivos. Un punto interesante de estos tres métodos es que producen un solo árbol con raíz, donde la longitud de la rama para dos OTUs cualquiera es la misma después de su separación.

Por su parte el NJT es un método de construcción de árboles aditivos en donde la premisa es que la longitud de las ramas entre un par de taxones de un árbol o dendrograma representa la cantidad de evolución o divergencia entre ellos. Este método produce un árbol sin raíz y usualmente requiere de un grupo externo.

V.5.1. Ligamiento Completo

En este árbol es posible apreciar que el conjunto de muestras correspondientes a cada una de las especies se agrupan entre sí bajo una mayor similitud, a las que se van uniendo conjuntos de muestras de otras especies, de tal modo que al final cada especie se presenta separada como una unidad.

Los valores de similitud entre las muestras de una misma especie varían ampliamente. Mientras especies como el grupo externo *Algansea*, presenta los mayores niveles de similitud entre sus individuos, los conjuntos de organismos de las diferentes especies de *Poblana* y *Chirostoma* en general manifiestan amplios niveles de divergencia.

La estructura jerárquica de las muestras manifiesta tres grandes grupos, el primero constituido por *P. letholepis*, *P.a. alchichia* y *C. jordani*, cuyo nivel de agrupación es de 0.313, el segundo por *P. a. squamata*, *C. arge* y *C. riojai* en un nivel de 0.281, el último formado por *C. consocium* y *Alagancea* en un nivel de 0.271. Los tres grupos se unen en un nivel muy bajo de similitud (0.188).

A nivel intergenérico podemos establecer que los taxones se mezclan; es decir, por un lado *C. jordani* se encuentra unido más próximamente a *P. letholepis* y a *P. a. alchichica*, pero por otra parte *P. a. squamata* se enlaza con *C. arge* y *C. riojai*, mientras el grupo externo *Algansea* se une a *C. consocium*.

El árbol construido por medio de este método muestra un valor de correlación cofenética de $r=0.86578$ y una probabilidad asociada de $P = 0.0025$ después de 1000 permutaciones (Fig. 7).

V.5.2 Agrupamiento por Promedio Aritmético No Ponderado UPGMA

En este método de agrupamiento se sostiene de igual modo la unidad de cada especie y el amplio intervalo de variación intraespecífica (Fig. 8). No obstante, existe

una diferencia sustancial entre el número de grupos y la forma en que se ordenan los taxones.

En este caso es posible distinguir seis niveles jerárquicos de agrupación. Un primer grupo formado por *P. letholepis* y *P. a. alchichica* en un nivel de 0.504, al cual se une un segundo grupo constituido por las especies *P.a.a squamata* y *C. jordani* a 0.456, en tercer orden se une *C. arge* (0.429), en cuarto lugar *C. riojai* (0.401), en quinto lugar *C. consocium* (0.333) y en el nivel mas bajo de similitud se une *Algansea* (0.325).

La asociación intergenérica para este caso se presenta solo entre *P. a. squamata* y *C. jordani*. El valor de correlación cofenética para esta representación gráfica es de $r= 0.89742$ y la probabilidad asociada al árbol fue de $P= 0.001$.

V.5.3 Agrupación por Promedios Aritméticos Ponderados (WPGMA)

El agrupamiento fue semejante a lo obtenido por las técnicas de UPGMA y Ligamiento Completo (Fig. 9). No obstante, para este caso solo se distinguen cinco grandes grupos, los cuatro primeros son los mismos que se presentan con el método UPGMA, *P. letholepis* y *P. a. alchichica* a un nivel de 0.470; *P. a. squamata* y *C. jordani* en 0.425; *C. arge* a 0.378; y *C. riojai*. a 0.374; sin embargo, bajo éste método, el quinto y sexto grupo obtenido por la técnica de agrupación por promedios no ponderados se fusionan y forman un grupo que incluye a *C. consocium* y *Algansea* (0.349). El coeficiente de correlación cofenética asociado al dendrograma es de 0.89245, con una probabilidad de 0.0013.

Los valores de correlación cofenética indican que las tres proyecciones representan adecuadamente la matriz original de datos de distancia. De tal forma, que las diferencias observadas con respecto a la relación que guardan los diferentes OTUs en los tres árboles, se deben o son resultado de sus propiedades matemáticas, más que a diferencias de tipo biológico. Además, la probabilidad asociada a cada proyección sugiere que es difícil que el árbol se haya originado o sea resultado del azar.

V.5.4 Método del Vecino mas Cercano (NJT)

El NJT como método de construcción de árboles aditivos aparte de mostrar la red general de relaciones entre los taxones analizados, ofrece la bondad de distinguir las diferencias en distancias evolutivas entre los descendientes de un ancestro común, así como estimar la distancia evolutiva entre taxones relacionados por medio de la suma de la longitud de las ramas que los separan.

La red de relaciones muestra que todas las muestras pertenecientes a una especie se anidan juntas, separadas por distancias evolutivas menores e independientes del resto de los taxones (Fig. 10, Tabla 27).

En general el árbol muestra dos grupos de orden superior, el primero de ellos relaciona a *Algansea*, *C. consocium*, *C. jordani* y *P. a. squamata*. El segundo asocia a *C. riojai*, *P. a. alchichica*, *P. letholepis* y *C. arge*.

V.5.5 Análisis por Componentes Principales

A pesar de que los métodos de agrupación producen clases discretas, aún cuando las OTUs son forzadas a unirse juntas arbitrariamente, en algunas ocasiones resultan ser métodos jerárquicos inapropiados cuando no se parte o asume algún tipo de estructura jerárquica. El análisis por componentes principales permitió definir las relaciones intra e intergenéricas, que en las técnicas de agrupamiento fue difícil de precisar (Fig. 11).

Los resultados muestran un campo amplio de variación entre el total de las muestras, donde se pueden distinguir seis grupos compactos conformados por una nube agregada de OTUs que corresponden a los taxones: *P. a. squamata*, *C. jordani*, *C. riojai*, *C. arge*, *C. consocium* y *Algansea*.

El resto de las especies si bien mantienen sus muestras próximas en el espacio, manifiestan cierto grado de dispersión, al grado que las muestras correspondientes a *P. letholepis* se separan ligeramente del conjunto de puntos correspondiente a *P. a. alchichica*. No siendo el caso de *C. riojai*, la cual manifiesta dispersión, pero por su aislamiento es fácil separarla del resto de los taxones.

La sobreposición del árbol de tendido mínimo sobre la representación gráfica de los OTUs en el espacio n-dimensional confirma la individualidad de cada taxon, y muestra la asociación estrecha entre las especies *Poblana a. alchichica* y *Poblana letholepis* (Fig. 12). Las líneas de unión entre los OTUs reflejan la asociación que muestran estas unidades, la cual resulta ser parecida al método del NJT.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los estudiosos de la diversidad definen a las unidades taxonómicas con la finalidad de dar un orden jerárquico natural a la diversidad biológica. No obstante, los sistemas de clasificación y los taxa poseen un carácter subjetivo dado por el número, tipo y valor de los caracteres empleados, así como por la interpretación misma que hace el investigador de ellos.

Por ello, actualmente, no es raro que los sistemas de clasificación y los taxa se redefinan o cambien continuamente como resultado del análisis de otros caracteres, por la modificación de los límites de los anteriormente utilizados, por la importancia relativa de los mismos o incluso por la corriente de pensamiento en que se desarrollan las nuevas propuestas.

A pesar de la subjetividad asociada con el ordenamiento de la diversidad, existen ciertos principios para su realización. En particular, el género es considerado una unidad cuya primera función es asociar semejanza, y no diferencia, ya que debe reflejar e incluir a un grupo de especies emparentadas. La diferencia o singularidad se expresa a través del nombre específico, y por lo tanto al nivel de especie. De esta manera, se considera que los géneros deben ser discontinuidades morfológicas bien definidas sin intermedios entre ellas.

El conocer la relación taxonómica que guardan las poblaciones de *Poblana* entre sí, y la relación de este género con respecto a *Chirostoma*, desde el mismo momento en que el primero fue descrito por De Buen (1945), ha conducido a diferentes autores a realizar estudios con diversos descriptores a fin de establecer la validez de estos taxa (Alvarez 1950, Solorzano y López 1965, Barbour 1973, Echelle y Echelle 1984, Guerra Magaña 1986).

Las conclusiones derivadas de estas investigaciones han dado como resultado que las cinco especies descritas originalmente para *Poblana* (*P. alchichica*, *P. a. squamata*, *P. letholepis*, *P. hidalgoi* y *P. ferdebueni*), se agrupan hoy en día en dos especies, *Poblana alchichica* tres subespecies (*P. a. alchichica*, *P. a. letholephis* y *P. a. squamata*) y *P. ferdebueni*.

No obstante, una conclusión importante que emana de algunos de estos estudios sugiere que *Poblana* y *Chirostoma* deberían ser agrupados en un solo

género, ya que el campo de variabilidad de caracteres genéticos se sobreponen fuertemente, lo que hace difícil su reconocimiento taxonómico. Esta última consideración ha dado origen a una controversia entre quienes sostienen que *Poblana* y *Chirostoma* son cosas diferentes (Guerra Magaña 1986) y entre los que piensan que debería ser una sola cosa (Echelle y Echelle 1984).

Los resultados de la presente investigación contribuyen de manera importante al esclarecimiento de esta disputa. En primer término los marcadores RAPD muestran que cada uno de los taxones de *Poblana* se constituyen como verdaderas unidades taxonómicas, cuyas diferencias no solo son cuantitativas sino también cualitativas, como lo sugieren la presencia de bandas específicas para cada uno de los taxones. Por ello, consideramos, que estos resultados no sustentan la propuesta de Alvarez (1950) y Guerra Magaña (1986) de considerar subespecies dentro del género *Poblana*, es decir, estas unidades taxonómicas deberían ser consideradas unidades a nivel específico.

A pesar de no haber incluido en este análisis a *Poblana ferdebueni*, la comparación enzimática de esta especie con *Poblana alchichica* llevada a cabo por Echelle y Echelle (1986), confirma la aseveración de que los taxones agrupados en *Poblana* deben ser consideradas unidades específicas.

Por otra parte, los marcadores RAPD también muestran la similitud genética y por tanto evolutiva de *Poblana* y *Chirostoma*. Esta situación había sido señalada con anterioridad en diversos estudios morfológicos y morfométricos, sin embargo, la sobreposición de sus caracteres diagnóstico y el análisis parcial del campo de variabilidad morfométrica tanto intraespecífica como intergenérica mostraron que estos géneros se entremezclan ampliamente.

A pesar de la mezcla de los caracteres diagnóstico y del campo de variabilidad morfométrica, los autores de estas investigaciones no han considerado agrupar a *Poblana* y *Chirostoma* en un sólo género, o bien buscar nuevos caracteres diagnóstico que resuelvan esta sobreposición. Así por ejemplo, por medio de un análisis morfométrico comparativo de las tres especies de *Poblana* de los Axalapas y tres poblaciones de *Chirostoma jordani* del centro de México Guerra Magaña (1986) concluye, que los resultados de su estudio demuestran una clara y contundente diferenciación a nivel genérico, y que las diferencias encontradas entre las especies

de *Poblana* corresponden a nivel subespecífico y por lo tanto las coloca como subespecies de *Poblana alchichica*.

Los trabajos moleculares a partir de aloenzimas plantean un escenario distinto de la proximidad genética y evolutiva de *Poblana* y *Chirostoma*, la cual conduce a conclusiones diferentes. En particular, Echelle y Echelle (1984) reconocen que los caracteres enzimáticos no proveen una amplia diferenciación intraespecífica e intergenérica en estos géneros, de tal forma que *Poblana* debería ser incluida dentro de *Chirostoma*.

Los marcadores RAPD sustentan esta aseveración, ya que de los 115 caracteres solo uno distingue a *Poblana* y uno al género *Chirostoma*, mientras cinco diferencian al género externo, es decir no hay una distinción intergenérica marcada entre estos aterínidos. Por otro lado, el análisis de similitud indica que las tres especies de *Poblana* no se agrupan juntas como debería esperarse si se tratara de un grupo monofilético, ya que mientras *Poblana a. alchichica* siempre se mantiene próxima a *P. letholepis*, *P. a. squamata* se agrupa con *C. jordani* o *C. arge*.

Una evidencia más en apoyo de este planteamiento son los niveles de agrupamiento entre los taxones, de modo tal que las especies *Poblana letholepis* y *P. a. alchichica* se unen en un nivel de similitud muy semejante al que presentan *P. a. squamata* y con *C. jordani* o *C. arge*. Esta relación no es un artefacto de los métodos de agrupación, ya que los métodos de ordenación y el árbol de tendido mínimo muestran asociaciones en el espacio semejantes.

En conclusión, consideramos, con base en los marcadores moleculares y en el escenario que describen los trabajos antecedentes, que es necesaria una revisión taxonómica de ambos géneros que contemple al campo de variabilidad de estos taxones y determine si *Poblana* puede ser considerado un género distinto a *Chirostoma*, y en función de ésto definir la situación de sinonimia o validez de las especies de *Poblana*.

Por último, los datos moleculares sugieren que la hipótesis del gran lago Plio-Pleistocénico debería ser reconsiderada como marco de referencia para explicar la diferenciación y origen de las especies del género *Poblana* y *Chirostoma* a partir de un ancestro común.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, J. (1950) Contribución al conocimiento de los peces de la Región de los Llanos, Estado de Puebla (México). *An. Esc. Nac. Cienc. Biol, Méx.* 6: 81-107.
- Alvarez, J. (1972) Algunos ejemplos de especiación en peces mexicanos. *Ciencia*, 13: 81-89.
- Amstrong, J., A. Gibbs, R. Peakall, and G. Weiller. (1994). The RAPD Distance Package. A computer program obtainable via anonymous ftp at WWW ftp: life.anu.edu.au/ftp/RAPDdistance.
- Arredondo, J.L., L. E. Borrego, R.M. Castillo y M.A. Valladolid (1983) Batimetría y morfometría de los lagos maars de la cuenca del oriental, Puebla, México. *Biótica*. 8: 97-191.
- Barbour, C.D. (1973) The systematics and evolution of the genus *Chirostoma* Swaison (Pisces, Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology DNA Botany*. 18: 97-191.
- Barbour, C. D. and B. Chernoff (1984) Comparative morphology and morphometrics of the pescados blancos (genus *Chirostoma*) from lake Chapala, México. pp. *In From Evolution of Fish Species Flock*. A.A. Echelle DNA Y. Kornfield (eds.). University of Maine at Orono Press.
- Black, W. C. and N.M. DuTeau (1997) RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies, *In The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*, J. Crampton (ed). Chapman and Hall, New York.
- De Buen, F. (1945) Investigaciones sobre ictiología mexicana. I. Atherinidae de aguas continentales de México. *Anales del Instituto de Biología*. 16: 475-532.
- Echelle, A.A. and A.F. Echelle (1984) Evolutionary genetics of a "species flocks" atherinid fishes on the Mesa Central of México. Pp. 93-109. *In Evolution of Fish Species Flocks* (Echelle, A.A. y I, Kornfield, eds). Univ. Maine Press, Toronto.
- Gasca-Durán, A. (1981) Algunas notas sobre la génesis de los lagos-cráter de la Cuenca del Oriental, Puebla-Tlaxcala-Veracruz. *Colección Científica*. 98. INAH, México.
- Guerra-Magaña, C. (1986) Análisis taxonómico poblacional de peces atherinidos (*Chirostoma* y *Poblana*) de las cuencas endorreicas del extremo sur del altiplano mexicano. *An. Esc. nal. Cienc. biol. Mex.*, 30: 81-113.

- Miller, R. R. (1966) Quaternary freshwater fishes of north america.pp. 569-579. In H.E. Wright, Jr. and D.G. Frey (eds). *The Quaternary of the United States*. Princeton University Press, Princeton.
- Miller, R.R. and M.L. Smith (1986) Origin and geography of the fishes of Central México. pp. 487-517. In Charles H. Hecutt and E.O. Wiley (eds.). *Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. Princeton Univ. Press, Princeton
- Polaco, J. O. y A. F. Guzmán (1992) El género *Poblana* De Buen (Pisces, Atherinidae: Menidiinae). *Manuscrito Inédito*.
- Prager, E.M. and A.C. Wilson (1976) Congruency of phylogenies derived from different proteins. *J. Mol. Evol.* 9: 45-57.
- Ramírez García, P y A. Novelo R (1984) La vegetación acuática vascular de lagos cráter del estado de Puebla, México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 46: 75-88.
- Reyes Cortés, M. (1979) Geología de la Cuenca del Oriental. Estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. *Colección Científica, Prehistoria*. INAH. México.
- Rohlf, F. J. 1992. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Ver 2.0. Exeter Publishing.
- Smith, M.L., T. M. Cavender and R.R. Miller (1975) Climatic and biogeographic significance of a fish fauna from the late pliocene and early pleistocene of the lake Chapala Basin (Jalisco, México). In G. R. Smith, N. E. Friedland (eds.) *Studies on Cenozoic Paleontology and Sattigraphy. Univ. Michigan Papers on Paleontology.* 12: 29-38.
- Solórzano, A. y Y. López (1965) Nueva especie de *Poblana* capturada en la Laguna de Almoloya o Chignahuapan, Estado de Puebla (México) (Pisc. Atherin.). *Ciencia.* 23: 209-213.

ESTUDIO FILOGENÉTICO Y TAXONÓMICO EN ESPECIES ENDEMICAS DEL GÉNERO *Poblana* De Buen (Pisces: Atherinidae)

OBJETIVOS

GENERAL

Establecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas de los diferentes taxones del género *Poblana* mediante marcadores moleculares.

PARTICULARES

- 1) Establecer las relaciones taxonómicas entre las poblaciones del género *Poblana*.
- 2) Determinar si las poblaciones del género *Poblana* son un grupo taxonómico diferente al género *Chirostoma*.
- 3) Establecer el o los probables ordenamientos filogenéticos a partir de los datos moleculares.
- 4) Determinar el grado de relación evolutiva y filogenética entre los géneros de *Poblana* y *Chirostoma*.

ANEXO

Tabla 1. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Poblana a. alchichica*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Poblana a. alchichica</i>	1	.018	72
<i>Poblana a. alchichica</i>	2	.019	76
<i>Poblana a. alchichica</i>	3	.018	72
<i>Poblana a. alchichica</i>	4	.019	76
<i>Poblana a. alchichica</i>	5	.017	68
<i>Poblana a. alchichica</i>	6	.024	96
<i>Poblana a. alchichica</i>	7	.020	80
<i>Poblana a. alchichica</i>	8	.029	116
<i>Poblana a. alchichica</i>	9	.024	96
<i>Poblana a. alchichica</i>	10	.019	76

Tabla 2. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Poblana a. squamata*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Poblana a. squamata</i>	1	.024	96
<i>Poblana a. squamata</i>	2	.019	76
<i>Poblana a. squamata</i>	3	.012	48
<i>Poblana a. squamata</i>	4	.029	116
<i>Poblana a. squamata</i>	5	.017	68
<i>Poblana a. squamata</i>	6	.017	68
<i>Poblana a. squamata</i>	7	.019	76
<i>Poblana a. squamata</i>	8	.020	80
<i>Poblana a. squamata</i>	9	.012	48
<i>Poblana a. squamata</i>	10	.018	72

Tabla 3. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Poblana letholepis*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Poblana letholepis</i>	1	.014	56
<i>Poblana letholepis</i>	2	.014	56
<i>Poblana letholepis</i>	3	.017	687
<i>Poblana letholepis</i>	4	.017	68
<i>Poblana letholepis</i>	5	.016	64
<i>Poblana letholepis</i>	6	.009	36
<i>Poblana letholepis</i>	7	.008	32
<i>Poblana letholepis</i>	8	.012	48
<i>Poblana letholepis</i>	9	.009	36
<i>Poblana letholepis</i>	10	.012	48

Tabla 4. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Chirostoma consocium*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Chirostoma consocium</i>	1	.025	100
<i>Chirostoma consocium</i>	2	.037	148
<i>Chirostoma consocium</i>	3	.058	232
<i>Chirostoma consocium</i>	4	.026	104
<i>Chirostoma consocium</i>	5	.045	180
<i>Chirostoma consocium</i>	6	.026	104
<i>Chirostoma consocium</i>	7	.046	184
<i>Chirostoma consocium</i>	8	.035	140
<i>Chirostoma consocium</i>	9	.033	132
<i>Chirostoma consocium</i>	10	.030	120

Tabla 5. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Chirostoma arge*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Chirostoma arge</i>	1	.020	80
<i>Chirostoma arge</i>	2	.013	52
<i>Chirostoma arge</i>	3	.015	60
<i>Chirostoma arge</i>	4	.011	44
<i>Chirostoma arge</i>	5	.018	72
<i>Chirostoma arge</i>	6	.028	112
<i>Chirostoma arge</i>	7	.014	56
<i>Chirostoma arge</i>	8	.010	40
<i>Chirostoma arge</i>	9	.012	48
<i>Chirostoma arge</i>	10	.021	84

Tabla 6. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Chirostoma riojai*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Chirostoma riojai</i>	1	.015	60
<i>Chirostoma riojai</i>	2	.015	60
<i>Chirostoma riojai</i>	3	.010	40
<i>Chirostoma riojai</i>	4	.015	60
<i>Chirostoma riojai</i>	5	.036	144
<i>Chirostoma riojai</i>	6	.076	304
<i>Chirostoma riojai</i>	7	.059	236
<i>Chirostoma riojai</i>	8	.024	96
<i>Chirostoma riojai</i>	9	.020	80
<i>Chirostoma riojai</i>	10	.015	60

Tabla 7. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Chirostoma jordani*

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Chirostoma jordani</i>	1	.014	56
<i>Chirostoma jordani</i>	2	.013	52
<i>Chirostoma jordani</i>	3	.018	72
<i>Chirostoma jordani</i>	4	.035	140
<i>Chirostoma jordani</i>	5	.012	48
<i>Chirostoma jordani</i>	6	.020	80
<i>Chirostoma jordani</i>	7	.019	76
<i>Chirostoma jordani</i>	8	.024	92
<i>Chirostoma jordani</i>	9	.011	44
<i>Chirostoma jordani</i>	10	.016	64

Tabla 8. Cuantificación de DNA por espectrofotometría en muestras de *Algansea*.

Especie	No. de organismo	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Algansea</i>	1	.036	144
<i>Algansea</i>	2	.022	88
<i>Algansea</i>	3	.017	68

Tabla 9. Lista de oligonucleótidos seleccionados y secuencia.

Primer"	Secuencia (10 bases)
R5	3'CCGCATCTAC5'
R7	3'AAGCCTCGTC5'
R8	3'CACACTCCAG5'
R10	3'TCGATACAGG5'
R18	3'GATCCAGTAC5'
R20	3'TCGGTCATAG5'
R22	3'GATCATAGCC5'
R25	3'GATCGCATTG5'
R31	3'TGGATTGGTC5'
R34	3'GGAACCATTG5'
R37	3'GTTTCGCTCC5'
R38	3'GGTGCTGGAA5'

Tabla 10. Patrón de bandeo por "primer" y número de pares de bases por banda.

"Primer"	No. de Bandas	Pares de Bases / banda
R5	12	2211, 1465, 1352, 1261, 1114, 1081, 898, 868, 653, 604, 471, 395.
R7	8	1311, 1099, 1052, 832, 536, 515, 448, 377.
R8	9	1353, 1018, 916, 872, 850, 785, 304, 283, 267
R10	10	1663, 1034, 1000, 877, 735, 702, 689, 525, 354, 300.
R18	9	1200, 1186, 978, 965, 451, 434, 408, 361, 241
R20	13	1414, 1305, 1178, 928, 825, 769, 744, 678, 515, 440, 405, 358, 277.
R22	8	1388, 1282, 1075, 868, 629, 566, 492, 377.
R25	7	1876, 1389, 1192, 977, 699, 565, 461.
R31	7	1180, 1070, 839, 758, 457, 310, 281.
R34	10	1714, 1461, 1394, 1076, 994, 904, 683, 549, 442, 405.
R37	10	1454, 1166, 1012, 865, 737, 590, 501, 466, 379, 314.
R38	12	1500, 1403, 1276, 1105, 902, 834, 770, 619, 570, 504, 413, 383.

Tabla 24. Marcadores moleculares para las especies del género *Poblana*.

Especie / Banda	R20 (358)	R10 (735)	R37 (1454)	R37 (737)	R34 (405)	R25 (1192)
<i>Poblana letholepis</i>		X				
<i>P. a. alchichica</i>	X				X	
<i>P. a. squamata</i>			X	X		X

Tabla 25. Marcadores moleculares para las especies del género *Chirostoma*.

Especie / Banda	R37 (466)	R34 (904)	R22 (1282)
<i>C. riojai</i>		X	
<i>C. arge</i>	X		X

Tabla 26. Marcadores moleculares a nivel de género para los taxones *Poblana*, *Chirostoma* y *Algansea*.

Género/ Banda	R20 (744)	R31 (1070)	R22 (868)	R18 (361)	R18 (241)	R8 (1353)	R5 (2211)
<i>Poblana</i>							X
<i>Chirostoma</i>			X				
<i>Algansea</i>	X	X		X	X	X	

Tabla 27. Relación de ciclos generados mediante el análisis NJT y longitud de las ramas.

Ciclo	OTU * NODO	Longitud de la Rama	Y	OTU * NODO	Longitud de la Rama
1	72	.024	"	73	.016
2	71	.042	"	*72	.033
3	64	.085	"	67	.110
4	41	.0141	"	42	.046
5	66	.104	"	69	.125
6	43	.064	"	44	.099
7	*64	.053	"	68	.100
8	48	.077	"	49	.057
9	45	.138	"	46	.117
10	*66	.029	"	70	.157
11	63	.142	"	*64	.026
12	62	.148	"	65	.198
13	*62	.005	"	*66	.019
14	*62	.010	"	*63	.023
15	13	.028	"	18	.023
16	54	.140	"	55	.138
17	38	.061	"	39	.070
18	61	.178	"	*62	.022
19	21	.063	"	22	.058
20	25	.097	"	26	.106
21	59	.076	"	60	.053
22	33	.087	"	37	.084
23	27	.103	"	28	.130
24	32	.097	"	34	.125
25	51	.080	"	57	.099
26	58	.085	"	*59	.027
27	47	.175	"	50	.141
28	*47	.002	"	*48	.054
29	*43	.074	"	*45	.068
30	*41	.102	"	*43	.006
31	5	.156	"	8	.104
32	*25	.032	"	*27	.011
33	29	.123	"	30	.092
34	23	.112	"	24	.127
35	*23	.013	"	*25	.126
36	53	.112	"	*58	.020
37	*23	.011	"	*29	.027
38	*21	.077	"	*23	.009
39	*51	.038	"	56	.170
40	52	.111	"	*53	.017
41	*41	.024	"	*47	.041
42	*33	.033	"	*38	.052
43	31	.080	"	35	.079
44	*31	.017	"	40	.151
45	*31	.006	"	*33	.023

Continua Tabla 27

Ciclo	OTU	Longitud de la Rama	"	OTU	Longitud de la Rama
46	*51	.026	"	*52	.022
47	*31	.022	"	*32	.066
48	*51	.013	"	*54	.110
49	*31	.029	"	36	.223
50	1	.098	"	2	.102
51	11	.050	"	20	.054
52	*61	.126	"	*71	.288
53	3	.133	"	*5	.037
54	6	.153	"	7	.111
55	4	.185	"	9	.138
56	*13	.059	"	15	.193
57	*4	.027	"	*6	.026
58	*1	.066	"	10	.183
59	*3	.048	"	*4	.013
60	*1	.024	"	*3	.022
61	*31	.064	"	*61	.041
62	*21	.120	"	*31	.002
63	*21	.024	"	*51	.079
64	*1	.048	"	*21	.039
65	*1	.014	"	*41	.113
66	14	.119	"	19	.178
67	12	.128	"	*14	.015
68	*1	.070	"	*12	.020
69	1	.070	"	17	.020
70	*1	.019	"	*13	.034
ÚLTIMO CICLO nodo 1	0.010	nodo 11	.041	nodo 16	.012

Fig. 1. Amplificación del "primer" R22. Mitad superior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174), 2-4 *C. jordani*, 5-10 *C. consocium*, 11-15 *P. letholepis*, 16 *P. a. alchichica*. Mitad inferior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174) 2-6 *P. a. alchichica*, 7-12 *C. riojai*, 13-16 *C. arge*.

Fig. 2. Amplificación del "primer" R10. Mitad superior, muestra 1 Marcador molecular (pUC-19). Muestra 2-4 *C. arge*, 5-14 *P. a. squamata*, 15 *C. jordani*, 16-17 *Algansea*. Mitad inferior, muestra 1 Marcador molecular (pUC-19), 2-4 *C. jordani*, 5-10 *C. consocium*, 11-14 *P. letholepis*.

Fig. 3. Amplificación del "primer" R 25. Mitad superior, muestra 1 Marcador molecular (pUC-19), 2-7 *C. jordani*, 8-13 *C. consocium*, 14-19 *P. letholepis*, 20-24 *P. a. alchichica*. Mitad inferior, muestra 1 Marcador molecular (pUC-19), 2-5 *P. a. alchichica*, 6-8 *C. riojai*, 9-13 *C. arge*, 14-23 *P. a. squamata*, 24 *C. jordani*.

Fig. 4. Amplificación del "primer" R37. Mitad superior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174), 2-7 *C. jordani*, 8-13 *C. consocium*, 14-17 *P. letholepis*. Mitad inferior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174) 2-3 *P. letholepis*, 4-12 *P. a. alchichica*, 13-15 *C. riojai*, 16-17 *C. arge*.

Fig. 5. Amplificación del "primer" R20. Mitad superior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174), 2-5 *C. jordani*, 6-11 *C. consocium*, 12-16 *P. letholepis*, 17-22 *P. a. alchichica*. Mitad inferior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174) 2 *P.a.alchicdhica*, 3-8 *C. riojai*, 9-13 *C. arge*, 14-15 *P. a. squamata*, 16 *C. arge*.

Fig. 6. Amplificación del "primer" R38. Mitad superior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174), 2-7 *C. jordani*, 8-13 *C. consocium*, 14-17 *P. letholepis*. Mitad inferior, muestra 1 Marcador molecular (\emptyset X174) 2-3 *P. letholepis*, 4-12 *P. a. alchichica*, 13-15 *C. riojai*, 16-17 *C. arge*.

Ligamiento completo

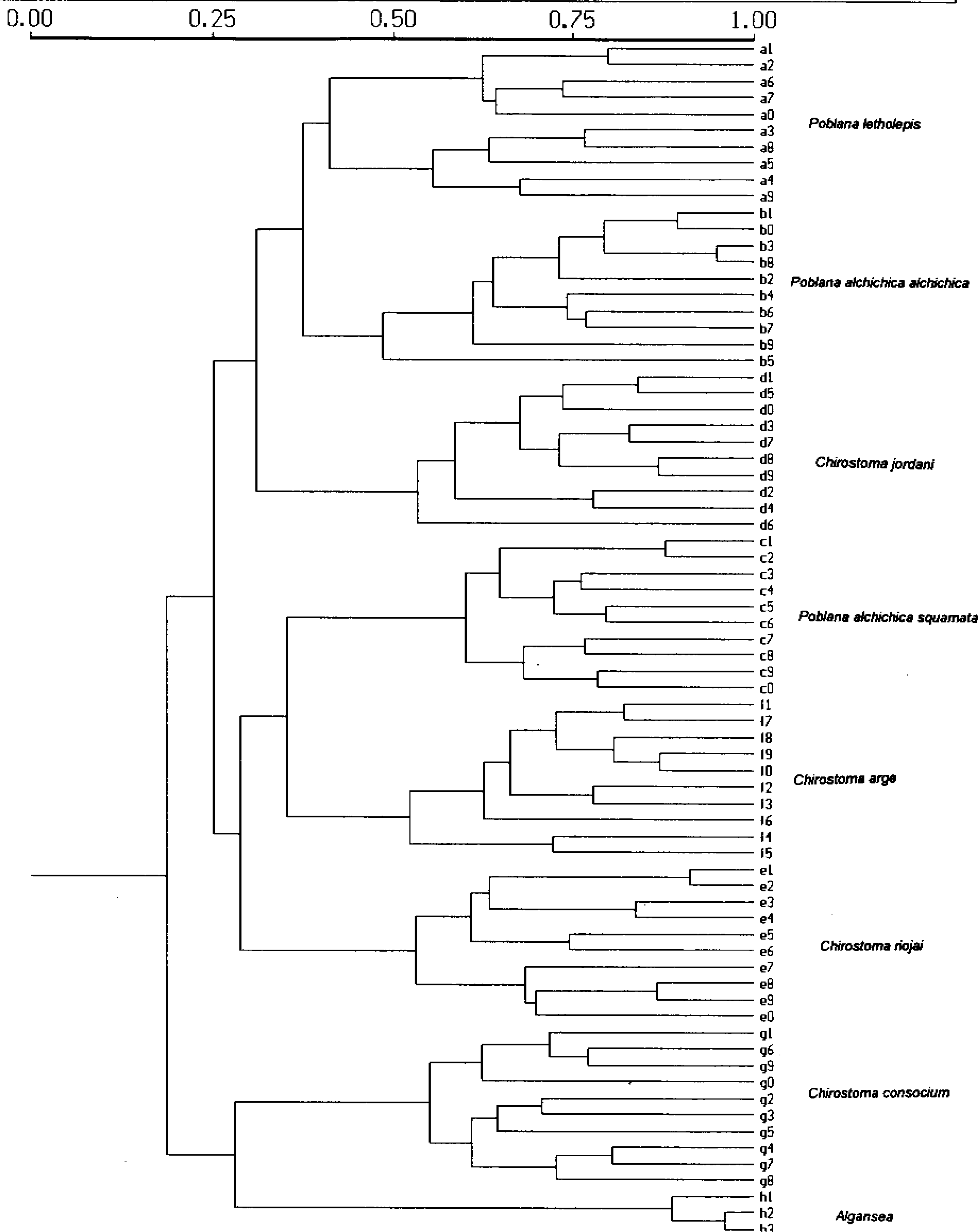


Fig. 7. Dendrograma construido mediante Ligamiento Completo. a- *Poblana letholepis*, b- *P. alchichica alchichica*, c- *P.a. squamata*, d- *C. jordani*, e- *C. riojai*, f- *C. arge*, g- *C. consocium*, h- *Algarsea*. $r = 0.86578$ $p = 0.0025$.

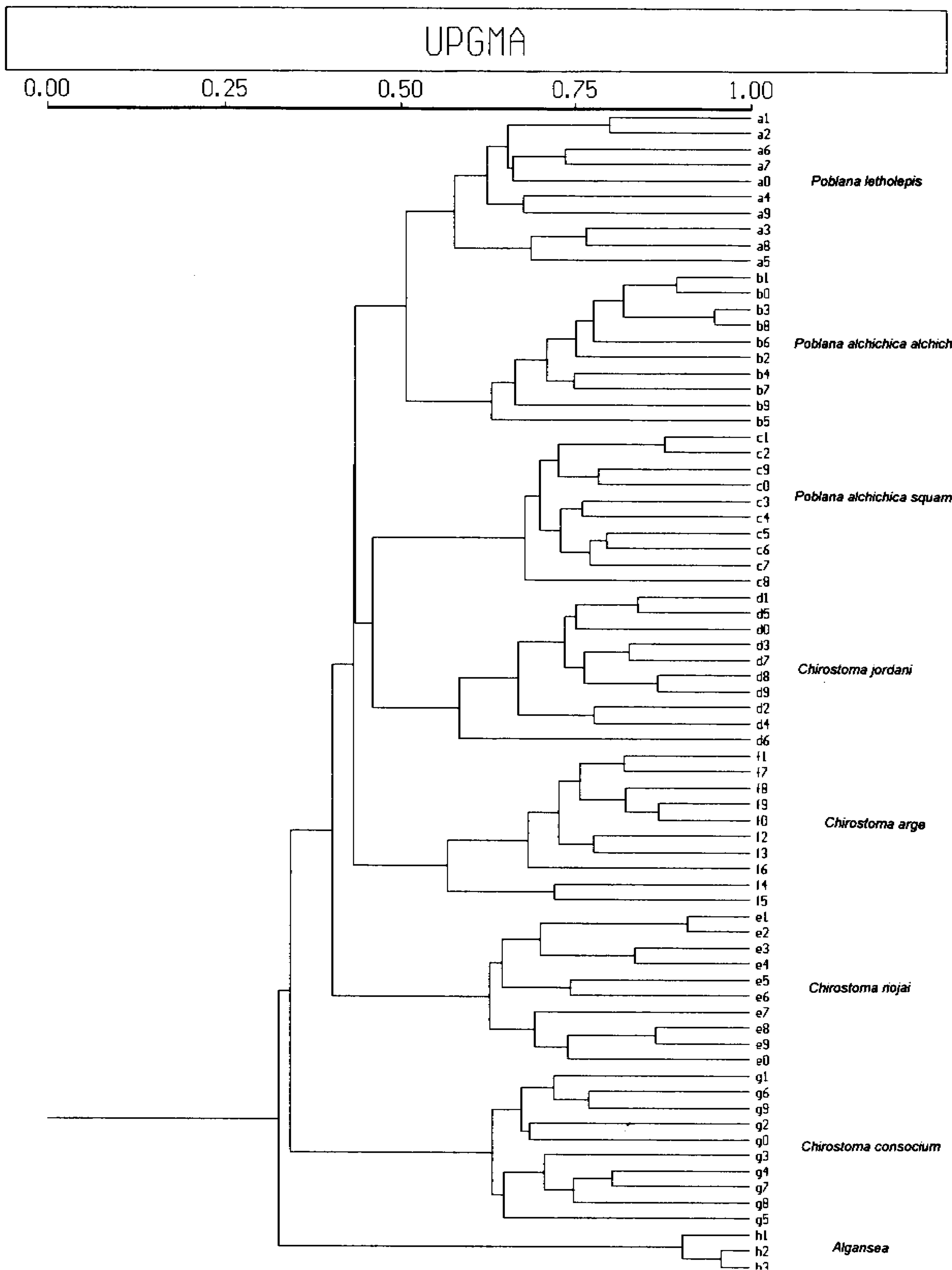


Fig. 8. Dendrograma construido mediante UPGMA. a- *Poblana letholepis*, b- *P. alchichica alchichica*, c- *P.a. squamata*, d- *C. jordani*, e- *C. riojai*, f- *C. arge*, g- *C. consocium*, h- *Algansea*. $r = 0.89742$ $p = 0.001$.

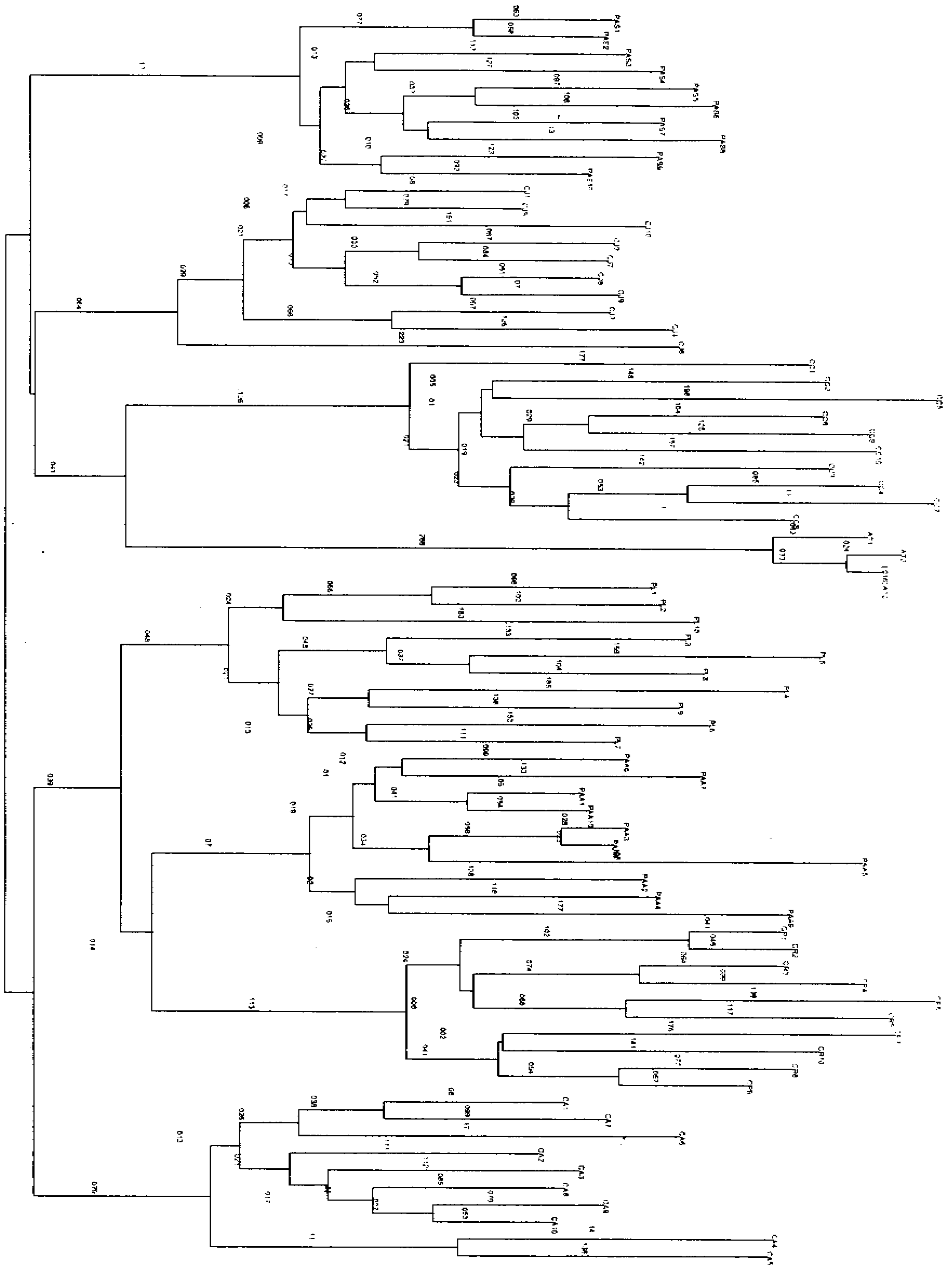
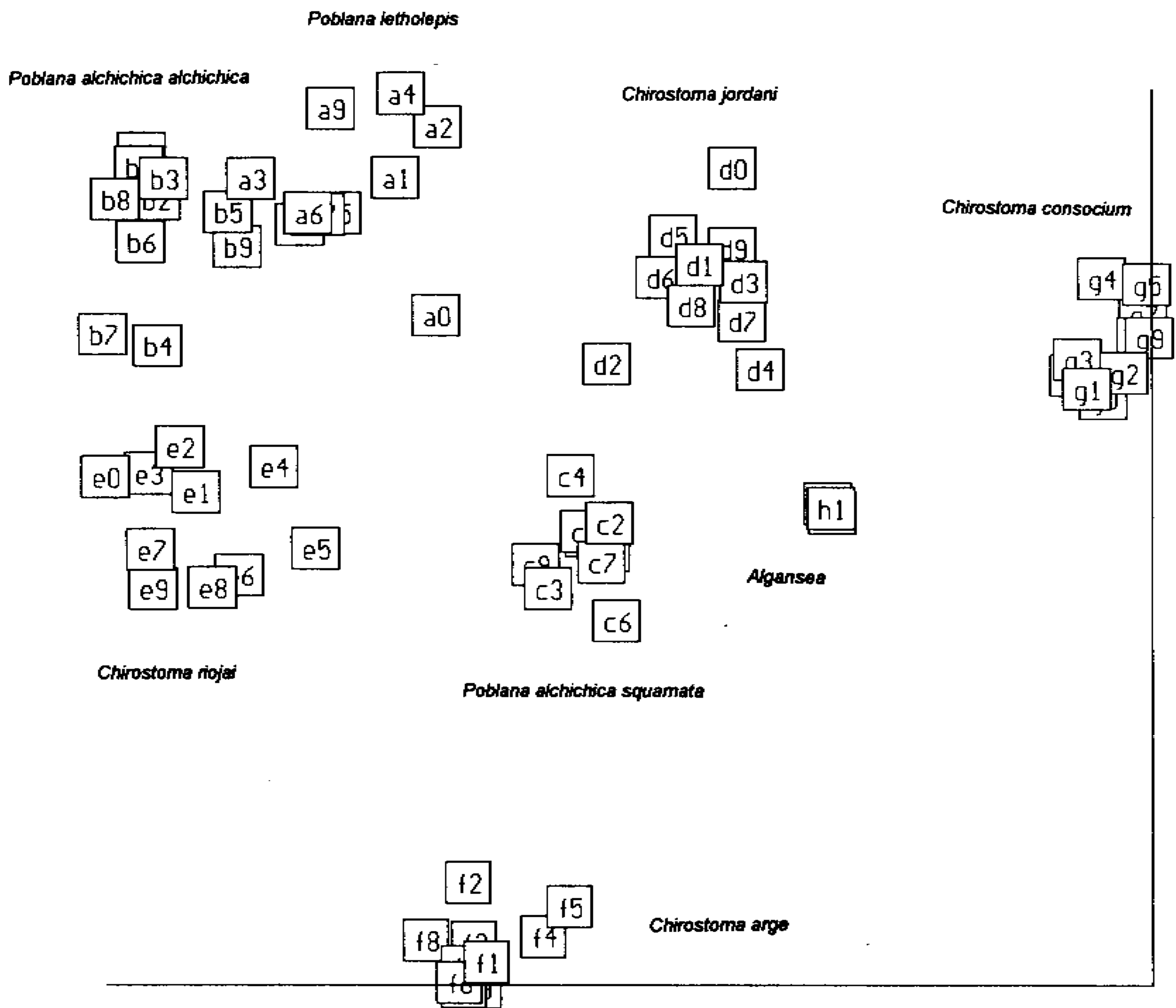


Fig.10. Árbol de relaciones obtenido por el método del Vecino más Cercano (NJT). PL- *Poblana letholepis*, PAA- *P. alchichica alchichica*, PAS- *P.a. squamata*, CJ- *C. jordani*, CA- *C. arge*, CR- *C. riojai*, CC- *C. consocium*, AT- *Algansea*.

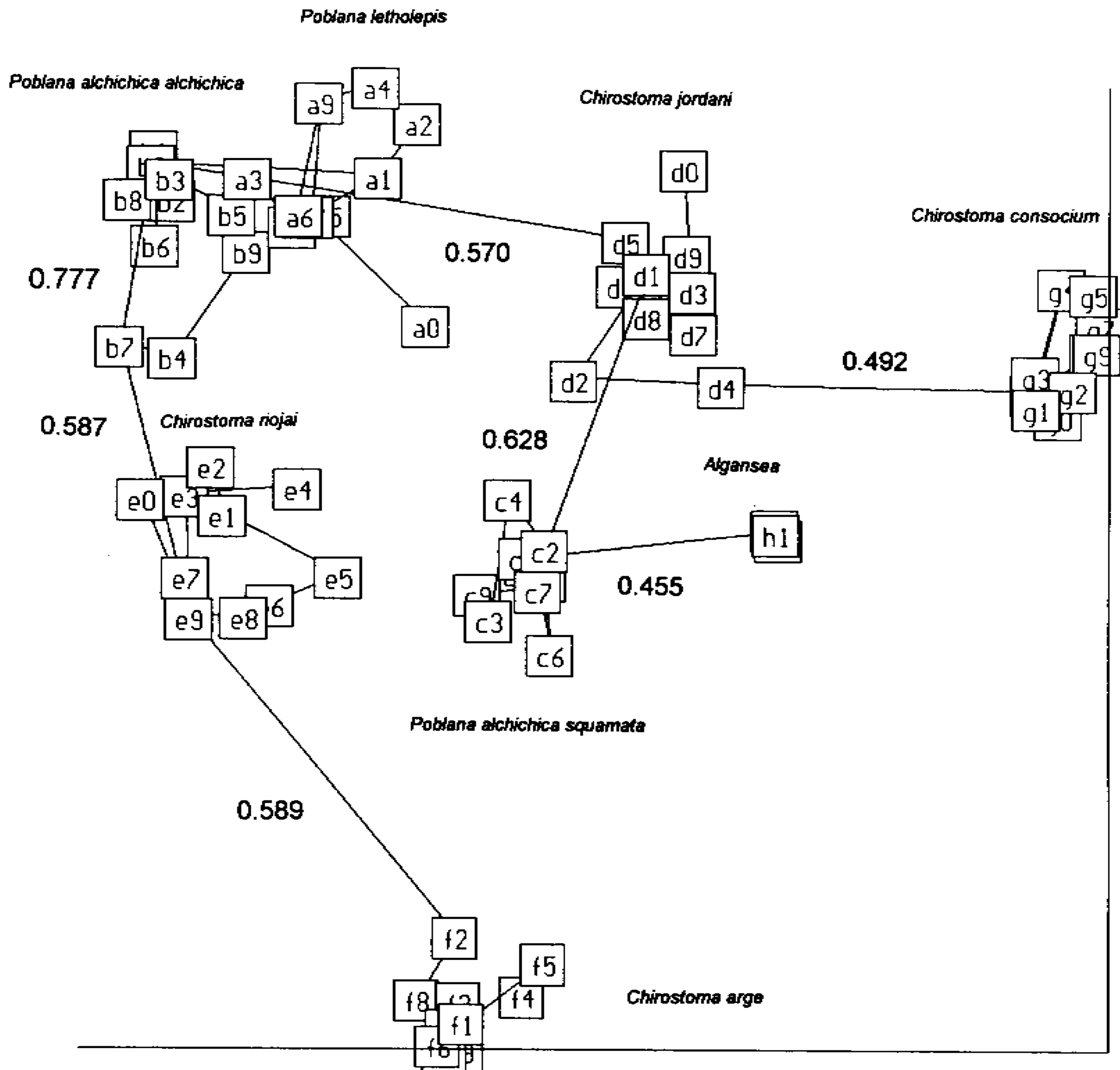
PCA



a=180 b= -0 r=99.0

Fig. 11. Análisis por Componentes Principales. a- *Poblana letholepis*, b- *P. alchichica alchichica*, c- *P.a. squamata*, d- *C. jordani*, e- *C. riojai*, f- *C. arge*, g- *C. consocium*, h- *Algansea*.

ARBOL TENDIDO MINIMO (MINIMUM SPANNING TREE)



a=176 b= -0 r=99.0

Fig. 12. Árbol de Tendido Mínimo (Minimum Spanning Tree). a- *Poblana letholepis*, b- *P. alchichica alchichica*, c- *P.a. squamata*, d- *C. jordani*, e- *C. riojai*, f- *C. arge*, g- *C. consocium*, h- *Alganssea*.