

Informe final* del Proyecto HB010
Código de barras de diferentes grupos de peces mexicanos endémicos de la Mesa Central Mexicana

Responsable: Dr. Omar Domínguez Domínguez
Institución: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Biología
Laboratorio de Biología Acuática.
Dirección: Edificio "R" Planta Baja, Morelia, Mich, 58030 , México
Correo electrónico: odoming@ccu.umih.mx
Teléfono/Fax: (443) 3 16 74 12
Fecha de inicio: Enero 15, 2010
Fecha de término: Marzo 9, 2012
Principales resultados: Base de datos, informe final, códigos de barras, fotografías.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Domínguez Domínguez O., Corona-Santiago D. K., Torres-Hernández E. y I. Doadrio. 2013. Código de barras de diferentes grupos de peces mexicanos endémicos de la Mesa Central Mexicana. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. HB010.** México, D.F.

Resumen:

Las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta muy importante para el estudio taxonómico y sistemático de la flora y fauna del planeta. En este sentido, los diferentes esfuerzos internacionales por conformar bases de datos de secuencias de ADN que estén disponible libremente en la red, como GenBank y BARCODE, han abierto grandes expectativas para el conocimiento y estudio taxonómico y sistemático de la flora y fauna. En particular el BARCODE pretende crear una librería genética para la identificación taxonómica de organismos, lo cual puede convertirse en una de las herramientas más importantes para la identificación taxonómica de diferentes especies. Los peces de aguas epicontinentales de México son de los grupos de vertebrados menos estudiados y muchos de ellos presentan problemáticas taxonómicas importantes, a tal grado que en los últimos años se han descrito al menos 6 especies y una nueva familia de peces endémicos de las aguas mexicanas. Es por ello que la generación de códigos de barras para las diferentes especies de peces de México es de suma importancia para el conocimiento y desarrollo taxonómico y sistemático de este grupo de vertebrados. El presente proyecto pretende generar los códigos de barras de un importante número de especies de peces endémicas que aun habitan la Mesa Central de México (58 especies), lo cual representa cerca del 60% de las especies que habitan la zona y el 35% de las especies endémicas de peces del país, este listado incluye a todas las especies existentes de Goodeidos y de Ciprínidos endémicas de esta región del país, además se pretende obtener secuencias de algunas especies que habitan la Mesa del Norte y cuenca del Pánuco, con lo cual se pretende secuenciar un total de 60 especies de peces, que equivale a aproximadamente el 11% de todas las especies de aguas epicontinentales registradas para el país. De estas 60 especies se pretende obtener un total de 148 secuencias, dentro de las cuales se incluiría la variabilidad genética interespecifica de aquellas especies que previamente se identificó una variabilidad importante. Palabras clave: Peces, Mesa Central, Mesa del Norte, Goodeidae, Cyprinidae

-
- * El presente documento 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
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Resumen:

La iniciativa del Barcode es un esfuerzo internacional de crear una librería molecular a partir de organismo voucher, iniciativa que ha abierto grandes expectativas para el conocimiento y estudio taxonómico y sistemático de la flora y fauna a nivel mundial. En el presente proyecto se obtuvieron secuencias del gen Citocromo Oxidasa subunidad I de especies de peces endémicos de México, lo cual supone un importante avance en la inclusión de especies mexicanas al proyecto del Barcode. Para el presente trabajo se obtuvieron 167 secuencias pertenecientes a 3 familias, 16 géneros y 37 especies de peces, las cuales fueron integradas al sistema BOLD dejándolas disponibles para la consulta pública. Todos los organismos voucher así como los tejidos utilizados para la obtención de secuencias quedaron resguardados en la Colección Ictiológica de la Universidad Michoacana (MICH.-PEC-227-07-09). Las distancias genéticas obtenidas para las diferentes poblaciones dentro de la misma especie se encuentran en un rango de DP= 0 a DP= 1.91. La especie que muestran la mayor variación interpoblacional es *Xenotoca eiseni*. Por su parte, la única especie que presentó un valor mayor a 2% es *Xenotoca variata*, esto cuando se comparan las poblaciones de la cuenca de Cuitzeo con respecto a las poblaciones de las demás cuencas analizadas (Pánuco y Lerma). La reconstrucción filogenética mostró a la mayoría de las especies como monofiléticas, sin embargo dos grupos de especies, *Allotoca meeki* y *Allotoca diazi*, *Ilyodon furcidens* e *I. whitei*, no presentaron monofilia recíproca, lo cual se atribuye a las bajas distancias genéticas, de la misma forma la especie *Xenotoca variata* y el género *Xenotoca* no presentan monofilia recíproca, lo cual concuerda con investigaciones previas que mencionan la presencia de más de una especie en *Xenotoca variata* y la necesidad de una revisión más profunda del género *Xenotoca* que ayude a elucidar su estatus taxonómico.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE BIOLOGIA

Informe final

Código de barras de diferentes grupos de peces mexicanos endémicos de la
Mesa Central Mexicana
Proyecto CONABIO HB010

Morelia, Michoacán a 19 de mayo de 2011

I. Introducción

Las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta muy importante para el estudio taxonómico y sistemático de la flora y fauna del planeta. En este sentido, los diferentes esfuerzos internacionales por conformar bases de datos de secuencias de ADN que estén disponible libremente en la red, como GenBank y BARCODE, han abierto grandes expectativas para el conocimiento y estudio taxonómico y sistemático de la flora y fauna. En particular el BARCODE pretende crear una librería genética para la identificación taxonómica de organismos, lo cual puede convertirse en una herramienta muy importantes para la identificación taxonómica de diferentes especies; principalmente donde los métodos tradicionales no son aplicables para la identificación, ya sea porque los organismos no están completos o bien se encuentran en estadio juvenil, lo cual dificulta el proceso. Por otro lado, permitiría identificar especies potenciales no reconocidas previamente. Los peces de aguas epicontinentales de México son de los grupos de vertebrados menos estudiados y muchos de ellos presentan problemáticas taxonómicas importantes, a tal grado que en los últimos años se han descrito al menos 6 especies y una nueva familia de peces endémicos de las aguas mexicanas.

El presente proyecto fue desarrollado en el periodo de Enero del 2010 a Mayo del de 2011. Se realizaron 3 salidas de campo a cuerpos de agua localizados en los estados de Michoacán, México, Jalisco, Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Zacatecas, Guanajuato, Colima, Durango, Aguascalientes, Sonora y Sinaloa. Se colectó un total de 230 organismos y muestras de tejido pertenecientes a 15 familias, 32 géneros y 60 especies de peces, de los cuales 10 especies y 22 organismos fueron utilizados para la obtención de secuencias incluidas en el presente proyecto. El tejido y ejemplares de las especies colectadas quedaron resguardadas en la Colección de Peces de la UMSNH para futuros proyectos. Con estas muestras, y las ya colectadas anteriormente por el Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, se lograron obtener 167 secuencias de 16 géneros y 37 especies del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI), las cuales fueron incluidas en su totalidad en el sistema BOLD bajo el proyecto denominado "Freshwater Fishes From Central Mexico FWFCM", siguiendo los lineamientos establecidos para ello, incluyendo

fotos de los 167 especímenes secuenciados. Cabe señalar que el total comprometido de secuencias para este proyecto fue de 154, por lo que se incluyeron 13 más de las establecidas en el convenio. De las especies comprometidas la única que no se logró la obtención de organismos y por lo tanto de secuencias fue *I. furcatus*, por la que las secuencias comprometidas de esta especie (2) fueron substituidas por 10 secuencias, 1 de la especie *Algansea amecae*, 2 de *Hubbsina turneri*, 5 de *Skiffia multipunctata* y 2 de *Skiffia francesae*, todas ellas endémicas de los cuerpos de agua del Centro de México.

II. Antecedentes

En México 520 especies de peces dulceacuicolas han sido descritas. De estas 163 son endémicas del país, siendo el país con el mayor número de endemismos de agua dulce en Norteamérica (CONABIO, 1998). La Mesa Central de México es considerada por el World Conservation Monitoring Center como una zona de especial interés en la conservación de la fauna de agua dulce (Groombridge y Jenkins, 1998). Cerca de 100 especies de peces han sido descritas, de las cuales el 70% son endémicas de esta zona (Guzmán-Arroyo, 1994). Esta diversidad es atribuida a diferentes factores tales como eventos geológicos que derivaron en la heterogeneidad de la fisiografía de la mayor parte del territorio y el aislamiento de grandes regiones, a su gran extensión latitudinal (32° 30' N – 14° 30' N), a la invasión de ancestros marinos a los ecosistemas dulceacuícolas, y a la influencia de dos regiones biogeográficas (Neártica y Neotropical), entre otros. Todos estos factores evidencian la existencia de procesos evolutivos que han originado la singular composición ictiofaunística registrada actualmente, incluso a nivel poblacional (Domínguez-Domínguez et al. 2006a; 2008a).

Más aun, estudios recientes han puesto de manifiesto la gran variabilidad genética intrapoblacional entre diferentes especies de peces de esta región de México (Schönhuth y Doadrio 2003; Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez et al., 2006a; 2008a; Schönhuth et al., 2008), incluso, a partir de estas divergencias encontradas, se han llegado a describir especies nuevas de peces dentro de la familia Goodeidae y Cyprinidae (Domínguez-Domínguez et al., 2007; 2008b; Pérez-Rodríguez et al., 2009), a pesar de ser

grupos taxonómicamente bien estudiados (Jordan y Everman 1896-1900; Meek 1902;1904; Hubbs y Turner 1939; De Buen 1941; Mendoza 1965; Álvarez del Villar 1970; Miller and Fitzimons, 1971; Fitzimons, 1972; Barbour, 1973; Parenti 1981; Chernof y Miller, 1986; Barbour y Miller 1994; Webb et al., 2004; Lyons y Mercado-Silva 2004; Miller et al., 2005), por otro lado, estudios recientes (Ornelas-García et al., 2008) han encontrada que los miembros del genero Astyanax y Bramocharax presentan una gran variación morfológica intra e interespecífica, sin embargo la variación genética entre estas especies es reducida, lo que ha llevado a la descripción de diferentes especies e incluso nuevos géneros dentro de un mismo linaje genético, como ejemplo tenemos la inclusión de poblaciones ciegas de Astyanax y de especies del género Bramocharax en linajes genéticos de especies riparias de Astyanax, con distancias genéticas entre estas menores al 1%. Todo lo anterior pone de manifiesto que el uso exclusivo de herramientas morfométricas, en algunas ocasiones, no son suficientes para poder identificar y ubicar de manera inequívoca algunas especies de peces, por lo cual, en casos como estos, el contar con bases de datos moleculares para la correcta identificación de especímenes colectados en campo se hacen indispensables.

Los estudios de biología molecular en el área de la sistemática y taxonomía de peces son escasos, dentro de los más relevantes en el en el área de la filogenias moleculares son: Schönhuth et al. (2000; 2008); Schönhut y Doadrio (2003); Doadrio y Domínguez-Domínguez (2004); Domínguez-Domínguez et al. (2006a; 2007; 2008b); en el área taxonómica y descripción de especies utilizando herramientas moleculares se tienen los trabajos de Meyer et al. (2001); Domínguez-Domínguez et al. (2007b, 2008b; 2009); Pérez-Rodríguez et al., (2009). Mientras que la eficiencia y dificultades del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I para la identificación de especies ha sido analizado para 61 especies de 31 géneros distribuidos en México y Guatemala (Valdez-Moreno et al., 2009).

III. Objetivo General

Obtener 154 secuencias de 37 especies de peces que habitan las aguas epicontinentales de México.

IV. Materiales y Métodos

Colecta de organismos

Para la colecta de organismos se utilizaron diversos métodos de colecta de acuerdo con el ambiente que se estaba muestreando. Para zonas loticas se utilizó principalmente equipo de electropesca y redes de tipo cuchara. Para los ambientes lénticos se utilizaron redes tipo chinchorro de diferentes dimensiones y abertura de malla, redes tipo atarraya y redes agalleras. A los organismos colectados se les cortó un trozo de aleta pectoral derecha, la cual fue colocada en viales de 2 ml con alcohol grado analítico y mantenidas en congelación (-20°C) en el banco de tejidos del Laboratorio de Biología Acuática. Los organismos fueron fijados en formol al 7% y preservados en etanol al 70%, todos los organismos fueron incorporados a la Colección de Peces de la Universidad Michoacana (CPUM; MICH.-PEC-227-07-09)), donde se incluyen todos los datos de campo correspondientes.

Extracción de ADN Genómico

El protocolo de extracción de ADN genómico (Sambrook, 1989) consiste en la digestión del tejido, limpieza de ácidos nucleicos y precipitación de ADN. Este proceso está basado en el protocolo "Fenol-Cloroformo" a través del método de digestión convencional de CTAB-Proteínasa K, para lo cual se siguieron los pasos que a continuación se describe:

Digestión

- a) Una pequeña porción del tejido es previamente triturado y colocado en un tubo de 1.5ml correctamente etiquetado.
- b) Después, se añaden 400µl de Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) que tiene la función de tampón (pH: 8) y participa en la digestión por su propiedad tensoactiva, además contiene principalmente Tris (Hidroximetilaminometano) y EDTA (Ácido Etilendiamintetraacético). El primero proporciona a la solución la propiedad de tampón por su capacidad de disociación molecular, mientras que el último es un inhibidor de las nucleasas liberadas al lisar las células, por lo que ayuda minimizando la degradación del ADN a través de su propiedad quelante.
- c) Finalmente se agregan 7µl de Proteínasa K fúngica (a partir de *Tritirachium album*) a 20mg/ml, que es el principal factor para la digestión (destrucción de membranas y degradación de proteínas), que a diferencia de otras enzimas, no

es inhibida por el EDTA y activa entre pH de 7 y 9 y con mayor eficiencia a una temperatura de 65°C.

- d) La muestra se expone a calor (65°C) y a agitación durante 24 hrs. en Termoblock o 2hrs. en Termomixer (de 700 a 1200rpm) para digerir el tejido en su totalidad.

Limpieza

Una vez digerido completamente el tejido, se lleva a cabo el proceso de “limpieza de los ácidos nucleicos” mediante la precipitación de material contaminante a través del protocolo Fenol-Cloroformo.

Primer Lavado:

- a) Se agregan dos disolventes orgánicos directamente a la muestra: 200µl de Fenol (Hidroxibenceno) y 200µl de Cloroformo (Triclorometano) (Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1). El Fenol permite desnaturalizar proteínas (nucleasas, proteasas, etc) y precipitarlas, el cloroformo ayuda a separar el fenol saturado y todos los contaminantes no necesarios formando una fase acuosa (superior), una orgánica (inferior) y una fase intermedia donde se concentra el ADN genómico, los lípidos de membrana y las proteínas desnaturalizadas respectivamente. La formación de fases más definidas son gracias al alcohol isoamílico.
- b) Se agita por 1min. en rotor y se centrifuga a 12000rpm durante 10 minutos para formar las fases antes mencionadas.

Segundo Lavado:

- c) Con ayuda de una micropipeta se recupera la mayor cantidad posible del sobrenadante (fase superior) que como anteriormente se mencionó, contiene los ácidos nucleicos. Este producto se coloca en un nuevo tubo de 1.5ml previamente etiquetado. Es importante manipular con sumo cuidado la muestra para no causar turbidez y contaminar nuevamente la muestra.
- d) De igual manera, se llevan a cabo los pasos a) y c) mencionados en párrafos anteriores, empleando las mismas técnicas y agregando 200µl de fenol y 200µl de cloroformo a la muestra. Se agita por 1min. en el rotor y se centrifuga a 12000rpm durante 10 minutos.

Tercer Lavado

- e) Se recupera la mayor cantidad posible del sobrenadante y se coloca en un nuevo tubo de 1.5ml previamente etiquetado.
- f) Finalmente se agregan 200µl de Cloroformo a la muestra para precipitar algún otro residuo que no haya sido eliminado en los anteriores lavados.
- g) Se mezclan mediante agitación en el rotor por 1min. y se prosigue a centrifugar a 12000rpm durante 10min.
- h) Nuevamente se recupera el sobrenadante y se continúa con la precipitación del ADN. Dicha maniobra se realiza con extrema precaución para maximizar la pureza del ADN.

Precipitación

El proceso de separación del ADN consiste en volver insoluble al ADN para así poderlo separar de una solución acuosa. Para ello:

- a) Añadimos 3 veces más un volumen de alcohol absoluto a -20°C en base al volumen final del sobrenadante (producto del proceso de limpieza del ADN); por ejemplo, en un volumen de 300µl obtenidos de sobrenadante agregamos 900µl de alcohol absoluto.
 - b) Agitamos gentilmente la solución. Esto permitirá que el ADN se vuelva insoluble y se precipite.
 - c) Se incuba a -20°C por 24hrs. y al término de dicho proceso se centrifuga la muestra a 13000rpm durante 20 min. para lograr precipitar por completo el ADN.
 - d) Finalmente se decanta la muestra y se resuspende la “pastilla” (ADN precipitado) en 100µl de agua inyectable.
 - e) Además, se corrobora la extracción de ADN bajo corrimiento por electroforesis (técnica de separación de moléculas en base a su movilidad en un campo eléctrico) durante 30min. en gel de agarosa al 1.5% usando TBE 0.5X (como fuente electrolítica, como tampón y como inhibidor de actividad enzimática), Azul de Bromofenol (como buffer de carga e indicador de migración) y Syber Safe (como agente colorante del ADN) y se observa bajo un transiluminador de UV a 250nm y fotodocumentador con filtro para Sybr Safe para su análisis.
- Preparación del gel de agarosa: agregamos agarosa pura (1.5gr) en TBE (98.5ml) disolviendo en su totalidad mediante la aplicación de calor y añadiendo a ésta solución 2ml de Sybr Safe a 100mg/ml y mezclamos;

vertimos en la cámara de electroforesis con sus respectivos moldes de orificios. Dejamos secar y sumergimos en TBE. Mezclamos 2µl de AND de muestra con 2µl de azul de bromofenol y depositamos una muestra por orificio. Se aplica la corriente eléctrica correspondiente durante el tiempo elegido.

Amplificación

Reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*)

La técnica de PCR tiene como fundamento la aplicación de una mezcla de componentes sustitutos de los factores que participan en el proceso natural de replicación de ADN en la célula. En otras palabras, es un proceso de replicación de ADN *in vitro*.

El proceso de la PCR se basa en utilizar cambios de temperatura para poder simular el proceso de desnaturalización, alineamiento de los primers al AND molde y la elongación de ADN (síntesis de ADN), llevando a cabo por varios ciclos, estos procesos generan de forma exponencial la secuencia que deseamos amplificar.

Componentes que hacen posible la PCR

La muestra de ADN de nuestro organismo de interés es sometida a una serie de elementos indispensables y controlados para el óptimo funcionamiento. Estos son:

- Los Cevadores o Primers; secuencias cortas complementarias del ADN molde que reconocen y se acoplan a una región específica del ADN y la delimitan, además son reconocidos por la *Taq* Polimerasa para amplificar la región elegida.
- DNTPs (desoxirribonucleótidos); que es “la materia prima” para la síntesis de ADN, es decir, son monómeros (bases nucleotídicas) constituyentes del ADN y que serán colocados de manera complementaria y consecutiva por la *Taq* Polimerasa al momento de la síntesis.
- MgCL₂ (Cloruro de Magnesio); cofactor para el correcto funcionamiento de la *Taq* polimerasa. Un exceso o decremento, causa mayores errores en la síntesis.
- Buffer para estabilizar el pH.

- *Taq* Polimerasa para la síntesis de ADN, que reconocerá los primers e iniciará la síntesis de ADN.
- Los primers específicos con los que hemos podido amplificar exitosamente el gen mitocondrial COI completo para peces de la familia Goodeidae, Cyprinidae e Ictaluridae; alrededor de 627pb, 657pb y 669pb respectivamente, son:

FISH1F (forward) 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3'
 FISH1R (reverse) 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3'
 (Ward et al. 2005; Ivanova et al. 2007)

LCO1490 (forward) 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'
 HCO2198 (reverse) 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'
 (Folmer et al. 1994; Webb et al. 2004)

Preparación de una muestra para PCR

La técnica inicia a partir de la muestra de ADN genómico extraído con anterioridad, y los pasos se enlistan a continuación:

Preparación de una solución Mix

La solución Mix (Tabla 1) consiste en una mezcla de los compuestos antes mencionados a concentraciones específicas para el correcto funcionamiento: Para una reacción a un volumen total de 12.5 µl.

Tabla 1. Componentes y volumen necesario para una reacción de PCR de 12.5 con 1min.

Compuesto	Volumen por reacción
H ₂ O	8.375µl
Buffer Tris-HCL 10X con MgCl ₂	1.25µl
MgCl ₂	0.3125µl
DNTPs 10mM	0.5µl
FISH1F 10µM	0.5µl
FISH1R 10µM	0.5µl
Taq. Polimerasa	0.0625µl
Total	11.5µl

Si se realiza más de una muestra, multiplicamos cada volumen por el número de muestras para obtener el volumen total para todas las muestras. Además,

añadimos un control negativo y un control positivo con el fin de eliminar el sesgo de la calibración de las micropipetas y descartar el mal funcionamiento de algún reactivo.

Una vez realizada la solución Mix, colocamos 28µl de la solución en tubos de 0.2ml los cuales son etiquetados antes de dicho proceso. Finalmente, agregamos a cada tubo 2µl de ADN de las muestras de interés correspondientes al tubo etiquetado y mezclando al mismo tiempo con la misma micropipeta.

Programa para PCR en el Termociclador

Finalmente colocamos las muestras en el termociclador procurando que el Lid (superficie superior que se postra sobre las muestras al cerrar el termociclador) se encuentre en perfecta posición y bien configurado el programa para la amplificación del gen.

En este caso, el programa de PCR utilizado para la amplificación del gen quedo de la siguiente forma:

Lid - 105°C

Desnaturalización Previa: 95°C 2min.

Desnaturalización 94°C 30seg.

Alineamiento

 LCO1490 y HCO2198 43°-52°C 30seg.

 FISH1F y FISH1R 54°C

Elongación 72°C 1min.

Por 35 ciclos

Elongación final 72°C 10min.

Finalmente, se corre nuestros productos de PCR a través de electroforesis en un gel de agarosa, este procedimiento es idéntico al utilizado para visualizar los

productos de extracción de ADN, finalmente lo observamos en un transiluminador.

Si la amplificación del gen resultó satisfactoria se procede a la preparación de estos productos para su secuenciación.

Preparación de productos de PCR para envío a secuenciación

Una vez obtenida la secuencia del gen COI se realiza el siguiente procedimiento:

- Revisamos la concentración del ADN amplificado en nuestras muestras mediante espectrofotometría. Para éste procedimiento hacemos una dilución de 1:50 de ADN, medimos la concentración haciendo 3 lecturas a valores de A260/280 (espectro óptico de absorbancia a longitudes de onda de 260nm y 280nm, capaces de detectar concentraciones de ADN o proteínas, respectivamente), con lo cual se obtiene el promedio de la concentración de ADN en la muestra. La concentración mínima requerida que nos exige el servicio de secuenciación es de 100ng/ml incluyendo un volumen mínimo de 30µl de producto por muestra.
- Una vez completado el volumen y la concentración requerida, las muestras son revisadas y enviadas al servicio de secuenciación Macrogen en Corea.

Obtención y alineamiento de secuencias

Una vez que el servicio de secuenciación envía las secuencias de cada una de las muestras se aplican métodos de alineamientos de secuencias. Para ello recurrimos al uso de software especializado en el análisis de secuencias como Mega V4 además de BioEdit V7.0.5. Una vez alineadas, las secuencias son revisadas a “ojo” y se corrige cualquier error evidente en las secuencias usando como punto de apoyo los cromatogramas. De igual forma nos apoyamos en secuencias del mismo gen y de especies cercanas que se encuentren depositadas en GenBank. Para esto hay que considerar que este proceso no es trivial, ya que sugiere estrictas normas y criterios y es la materia primar con la que realizaremos todos los análisis posteriores.

Cada secuencia obtenida es la parte complementaria de la siguiente respecto a la muestra, esto es porque uno de los primers permitió amplificar hacia un extremo del gen, y el otro, hacia el lado contrario. Para ello, el software nos

permite empalmar dichas secuencias y generar una sola con altísimo grado de confiabilidad (sin descartar la información aportada por el cromatograma) y cortar los extremos de la misma que corresponden al primer y a señales que son de baja intensidad con ayuda de las secuencias base. Este procedimiento se repite para todas las secuencias.

Obtención de árboles filogenéticos

Todas las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el método del Vecino más Cercano utilizando el programa Mega 4.0, bajo las distancias no corregidas (p-distances) y 1500 replicas de Bootstrap.

Obtención de fotografías

La captura de fotografías se realizó mediante el uso de cámara digital marca CANON EOS DSI 126 con una resolución de 3088x2056 pixeles. El total de los organismos fotografiados (167) fueron colocados bajo una escala y la etiqueta correspondiente con la siguiente información:

- Familia a la que pertenece el organismo
- No. de Catálogo en el que se ubica en la colección
- Nombre Científico
- Localidad, municipio, cuenca y estado de colecta
- Fecha de colecta
- No. de ejemplares colectados
- Sustancia con la que se realizó la fijación de los organismos.
- Determinador
- Coordenadas del sitio de colecta
- Observaciones

V. Resultados

Secuencias obtenidas

Se obtuvieron un total de 167 secuencias de 3 familias, 16 géneros y 37 especies distribuidas a lo largo del territorio Mexicano (Fig. 1), tanto en cuencas de la vertiente del Golfo de México como del Pacífico, siendo el sistema Lerma Santiago el más representado (Tabla 2).

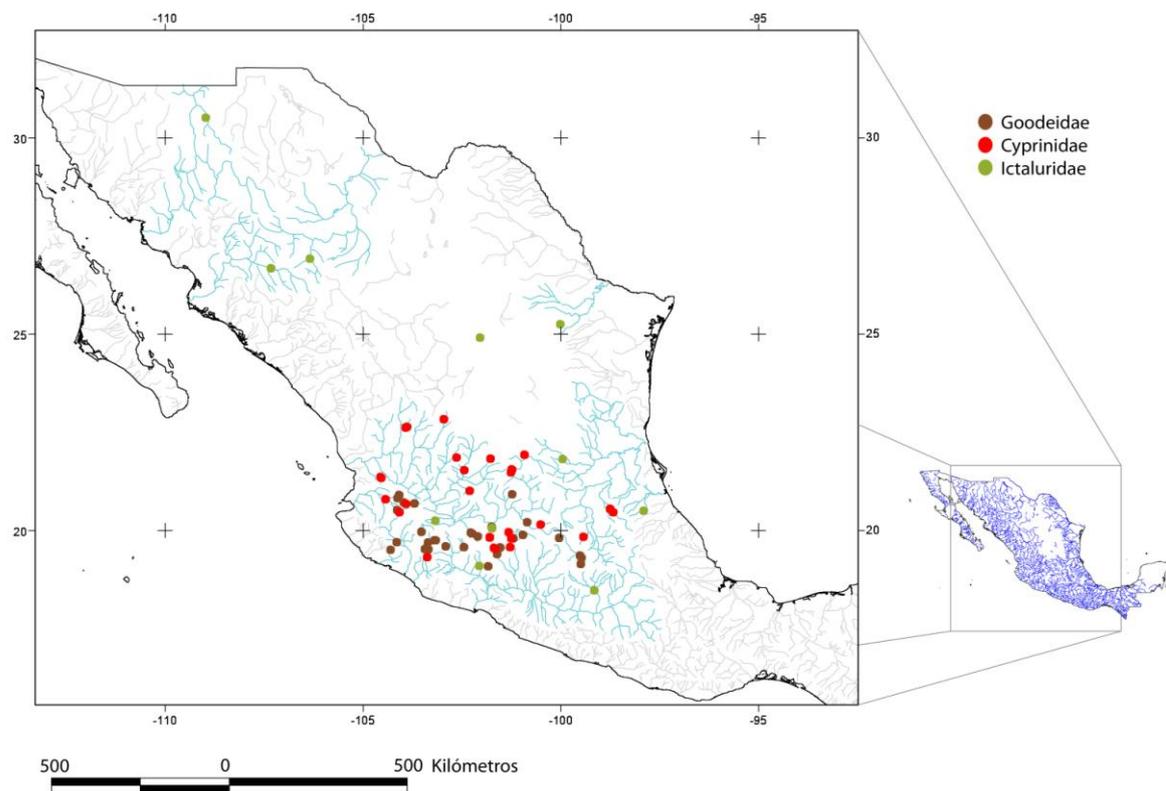


Fig. 1. Distribución espacial de los organismos secuenciados

Tabla 2. Total de secuencias obtenidas.

Familia	Especie	ID	Municipio/Región	Localidad
Goodeidae	<i>Alloophorus robustus</i>	F6188	ANGAMACUTIRO, Lerma-Santiago	Presa el Rosario, poblado Agua Caliente
		F6189		
		F1342	MORELIA, Lerma-Santiago	Manantial La Mintzita
		F745	PATZCUARO, Lerma-Santiago	Reserva Ecológica de Urandén
	F743			
	<i>Allotoca diazi</i>	F10192	PATZCUARO, Lerma-Santiago	Manantial Chapultepec
		F9855		
		F9847		
		F9846		
	<i>A. meeki</i>	F9823	SALVADOR ESCALANTE, Balsas	Presa de Opopeo
		F9825		
		F9818		
		F9816		
		F9832		
<i>Girardinichthys multiradiatus</i>	F4-1	LERMA, Lerma-Santiago	Santa Cruz Chignahuapan	
	F4-2			
	F12670		Casa Blanca (Tierras Nuevas)	
	F12614			
	F12674	EL ORO, Lerma-Santiago	Bordo de carretera El Oro-Atlacmulco	

<i>Goodea atripinnis</i>	F12627	ALMOLOYA DEL RIO, Lerma-Santiago	Laguna de Almoloya
	F10330	QUERENDARO, Lerma-Santiago	Lago de Cuitzeo, descarga del Rio Queréndaro
	F10296	PATZCUARO, Lerma-Santiago	Manantial Molino de Chapultepec
	F10295		
	F10294		
<i>Hubbsina turneri</i>	F10293		
	F13223	ZACAPU, Lerma-Santiago	Laguna de Zacapu
<i>Ilyodon furcidens</i>	F13222		
	F9396	SANTA MARIA DEL ORO, Balsas	Manuel M. Diéguez
	F9265	PIHUAMO, Armería-Coahuayana	Puente en el arroyo del poblado de San José del Tule
	F11990	VILLA PURIFICACION, Armería-Coahuayana	Sacachales poblado El Aguacate
	F11989		
<i>I. whitei</i>	F9282	TAMAZULA DE GORDIANO, Armería-Coahuayana	Los Pitayos
	F123-1	AMECA, Ameca	Puente La Muerta carretera Ameca-Mascota
	F122		
	F12077	TAMAZULA DE GORDIANO, Armería-Coahuayana	Rio Las Garitas, Las Juntas en el poblado de Contla
	F12056		Los Pitayos
<i>Neophorus regalis</i>	F12022	TUXPAN, Armería-Coahuayana	Atenquique
	F340-1	NUEVO URECHO, Balsas	Rio de Las Trojes
	F13227	LOS REYES, Balsas	Arroyo en Los Reyes
	F13226		
	F13225		
<i>Skiffia francesae</i>	F13224		
	F10580	ATOYAC, Lerma-Santiago	Manantial Cuyacapan
<i>S. lermae</i>	F10564		
	F10166	MORELIA, Lerma-Santiago	La Mintzita
	F10165		
<i>S. multipunctata</i>	F10257	PATZCUARO, Lerma-Santiago	Manantial Chapultepec
	F10256		
	F10255		
	F10503	JACONA, Lerma-Santiago	Manantial El Platanal-Rio Duero
	F10487		
<i>Xenotaenia resolanae</i>	F10455	CHILCHOTA, Lerma-Santiago	Manantial La Toma-Rio Duero
	F10454		
<i>Xenotoca eiseni</i>	F10453		
	F8802	CUAUTITLAN DE GARCIA BARRAGAN, Costa de Jalisco	Puente sobre el arroyo
	F11759	SAN JUANITO ESCOBEDO, Lerma-Santiago	Balneario Almoloya, poblado de Almoloya
	F13038	TECALITLAN, Armería-Coahuayana	Ciénega Arroyo la Purísima, poblado Santiago
	F13030		
<i>X. melanosoma</i>	F12036	TAMAZULA DE GORDIANO, Armería-Coahuayana	Santa Cruz del Cortijo (Vista Hermosa)
	F11926	ETZATLAN, Ameca	San Sebastián
	F11755	SAN JUANITO ESCOBEDO, Lerma-Santiago	Balneario Almoloya, poblado de Almoloya
	F11882	AMECA, Ameca	Puente La Muerta
	F11851	AHUALULCO DE MERCADO, Ameca	Ahualulco de Mercado

<i>X. variata</i>	F11802	TALA, Ameca	Rio Salado
	F4910	SALVATIERRA, Lerma-Santiago	Manantial junto a la Iglesia
	F12845	SAN FELIPE, Panuco	Puente Amarillo Rio Piedras
	F12781	GUANAJUATO, Lerma-Santiago	Rio San José del Rodeo
	F10357	HUANDACAREO, Lerma-Santiago	Ojo de Agua San Cristobal
	F10448	ANGAMACUTIRO, Lerma-Santiago	Presas el Rosario, poblado de La Palma
<i>Zoogoneticus purhepechus</i>	F10447		
	F10586	ATOYAC, Lerma-Santiago	Manantial Cuyacapan
	F10585		
	F10483	JACONA, Lerma-Santiago	Manantial en el poblado de El Platanal (La Planta), Rio Duero
<i>Z. quitzeoensis</i>	F10482		
	F11739	SAN JUANITO ESCOBEDO, Lerma-Santiago	Balneario Almoloya, poblado de Almoloya
	F11738		
	F2480	TARIMBARO, Lerma-Santiago	Pueblo Santa María (Mesa de la Bembérica)
	F2485		
	F2483		
	F2482		
	F2481		
Cyprinidae			
<i>Algansea amecae</i>	F3658	AMECA, Ameca	Arroyo en la Barranca del Poblado de La Coronilla
<i>A. aphanea</i>	F1268	PIHUAMO, Armería-Coahuayana	Puente en el arroyo del poblado de San José del Tule
	F1267		
	F1266		
<i>A. avia</i>	F10637	SANTA MARIA DEL ORO, Lerma-Santiago	Santa María del Oro
	F10636		
	F10635		
	F4076		Arroyo en el camino de Santa María del Oro-La Cofradía
<i>A. lacustris</i>	F4075		
	F9706	PATZCUARO, Lerma-Santiago	Reserva Ecológica de Urandén
	F9647		Lago de Pátzcuaro
	F9646		
	F9645		
<i>A. monticola</i>	F3023		Reserva Ecológica de Urandén
	5706	JEREZ, Lerma-Santiago	Presas El Tesoro, carretera Jerez-Fresnillo
	5705		
	5704		
	5702		
	F850	HUEJUQUILLA EL ALTO, Lerma-Santiago	Arroyo de San José-Santiago
	F849		Arroyo 500 m al Este de Huejuquilla, carretera Huejuquilla-Valparaiso
	F871	JEREZ, Lerma-Santiago	Presas El Tesoro, carretera Jerez-Fresnillo
<i>A. tincella</i>	F5651	VILLA REYES, Panuco	Jesús María, Puente del ferrocarril
	F5650		
	F4922	SAN FELIPE, Panuco	Barranca Rio Piedras, San Felipe
	2531	HUANDACAREO, Lerma-Santiago	Ojo de Agua San Cristobal
	4936-1	SAN FELIPE, Panuco	Rio Bravo, poblado de La Biznaga
	F407-1	VILLA REYES, Panuco	Arroyo del puente del ferrocarril en el poblado de Jesús María

<i>Notropis amecae</i>	F4643-2	TEUCHITLAN, Ameca	Puente Chapulimita, carretera Carmen-Teuchitlán	
	F4641			
	F4642			
	F4643			
	4637			
	4636			
	4640		Carretera Carmen-Teuchitlán	
	4639			
	<i>N. calientis</i>	F10160	MORELIA, Lerma-Santiago	Manantial La Mintzita
F10159				
F10158				
F5820		OJUELOS DE JALISCO, Lerma-Santiago	Presa al norte del poblado de La Paz, carretera 70 (Aguascalientes-Ojuelos)	
<i>N. grandis</i>	F4933	SAN FELIPE, Lerma-Santiago	Manantial arriba del Seminario	
	F9181	ZACAPU, Lerma-Santiago	Laguna de Zacapu Estación 2, Ojo de Agua-Rio Angulo	
	F9180		Laguna de Zacapu: Estación 2, Angostura-Rio Angulo	
	F3709		Laguna de Zacapu: Estación 2, Angostura	
	F3708			
	F3275		Laguna de Zacapu: Estación 3, Ojo de Agua	
	F6304	MORELIA, Lerma-Santiago	El Salto de Chiquimitio	
<i>N. sallaei</i>	F6303			
	F8746	VILLA DEL CARBON, Panuco	Rio Tepeji en el poblado de San Luis Taxhimay, antes de la presa Taxhimay (en el puente)	
<i>Tampichthys ipni</i>	F3549	METZTITLAN, Panuco	Rio Metztlán Jilotla	
	3579		Puente Rio Metztlán Venados	
	3578			
	3574-1			
	3575			
	3572			
	3553		Rio Metztlán Jilotla	
	3557-1			
	3555			
	3548			
<i>Yuriria alta</i>	F9307	MORELIA, Lerma-Santiago	La Mintzita	
	F9353	JERECUARO, Lerma-Santiago	Las Crucitas, Rio Trigre	
	F880	TEOCALTICHE, Lerma-Santiago	Puente en el Rio Aguascalientes en el Poblado de Belén del Refugio	
	F878	CALVILLO, Lerma-Santiago	Rio Gil-Calvillo, camino rural Tapias Viejas-Ojocaliente, rumbo a Malpaso, en el potrero rojo	
	4671	SAN MIGUEL EL ALTO, Lerma-Santiago	Puente carretera San Miguel el Alto, Rio Jalostotitlán	
<i>Y. amatlana</i>	F1205	AMATLAN DE CANAS, Ameca	Rio Chiquito de Amatlán de Canas	
	F1209			
	F1208			
	F1207			
	F1206			
Ictaluridae	<i>Ictalurus balsanus</i>	4994-1	GABRIEL ZAMORA, Balsas	Rio Marquez
		F1915	TLAQUILTENANGO, Balsas	Rio Amacuzac cerca de Huixtla

	F1912		
<i>I. dugesii</i>	5019-1	OCOTLAN, Lerma-Santiago	Ocotlán
	5018-1		
	5014		
	6182	ANGAMACUTIRO, Lerma-Santiago	Rio Angulo en el poblado el Sabino
	6224		
<i>I. lupus</i>	7024	BALLEZA, Bravo-Conchos	Rio Porvenir, carretera La Magdalena-Balleza
	6374	MELCHOR OCAMPO, Nazas-Aguanaval	Canal de Charco Prieto
	F2402	ALLENDE, Bravo-Conchos	Rio Ramos Allende
<i>I. mexicanus</i>	4800	RIOVERDE, Panuco	Sequia, cerca de La Plazuela
<i>I. pricei</i>	7060	GUACHOCHI, Sinaloa	Rio Guerachi
	7073		
	7064		
	7059		
	8011	BAVISPE, Sonora Sur	Rio Bavispe en el poblado de San Miguelito
<i>I. punctatus</i>	3474-1	PANTEPEC, Tuxpan-Nautla	Puente Pantepec, entre Pantepec y Mecapalapa

El 94% de las secuencias tienen una calidad alta y sólo el 1.8% muestra una calidad baja, pero sin entrar al grado de no confiabilidad, es decir, podemos tener seguridad de que éstas no presenta un grado de irregularidades que comprometan la confiabilidad de las mismas (Tabla 3). La calidad de las secuencias está basada en las irregularidades causadas por el proceso de secuenciación no inteligibles en el comatograma.

Tabla 3. Calidad de Secuencias

Marcador	Alta (%)	Media (%)	Baja (%)	No confiable (%)
COI	94.01	4.19	1.8	-0

Arboles filogenéticos

El árbol filogenético obtenido se muestra en las Figuras 2, 3 y 4, en la cual se observa que la mayoría de las especies muestran monofilia reciproca. Sin embargo, algunas especies de Goodeidos, como lo son *Allotoca meeki* y *A. diazi*, *Ilyodon furcidens* e *I. whitei*, así como *X. variata* no son monofiléticos. En el caso de los dos primeros pares de especies puede ser explicado por las bajas divergencias genéticas que existen entre estas especies hermanas, especies para las cuales existe un fuerte controversia en torno a la validez taxonómica de estas, pues diferentes autores consideran *A. meeki* como sinonimia de *A. diazi* e *I. furcidens* como sinonimia de *I. withei* (Doadrio y

Domínguez, 2004; Webb et al., 2004; Domínguez-Domínguez et al., 2011), por lo que la información obtenida en el presente proyecto es congruente con trabajos previos. Por otro lado, *X. variata* aparece como un grupo polifilético, ya que la población de Cuitzeo es altamente divergente y se posiciona como grupo hermano del clado formado por *A. robustus* y el resto de las secuencias obtenidas para *X. variata*, esta información es congruente con lo establecido por Domínguez-Domínguez et al. (2011), donde se especifica que la población de *X. variata* del Lago de Cuitzeo podría ser considerada como una entidad taxonómica independiente. De la misma forma las especies analizadas del género *Notropis* no son recuperados como monofiléticos, lo cual no coincide con trabajos previos que usan marcadores nucleares y mitocondriales (Shönhuth et al., 2008), lo cual puede ser atribuible al gen utilizado.

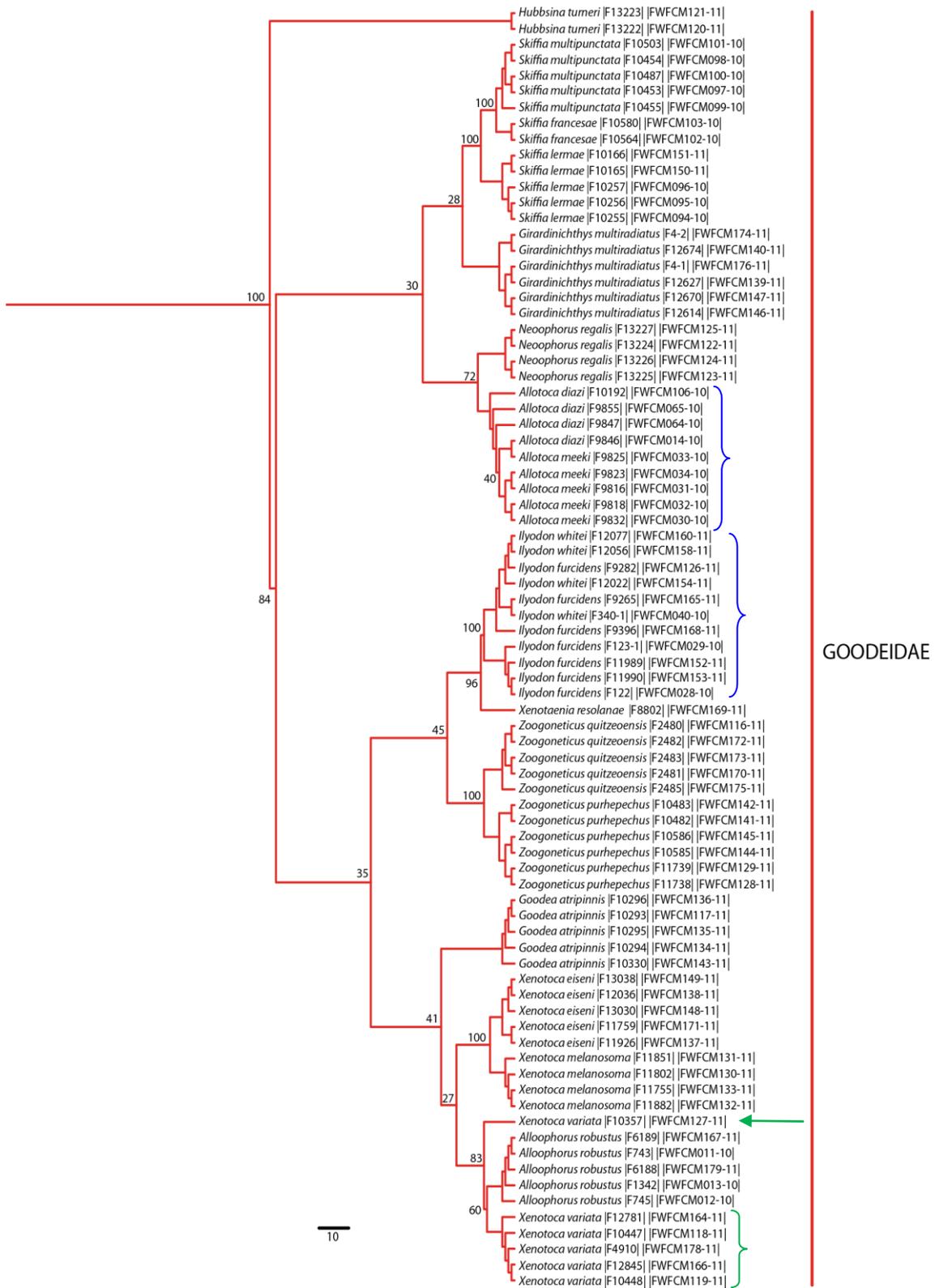


Fig. 2. Relaciones Filogenéticas de la familia Goodeidae a través del gen mitocondrial Citcromo oxidasa subunidad I. Los corchetes en azul indican las especies no monofileticas con bajas divergencias y en verde la especie no monofiletica con altas divergencias.

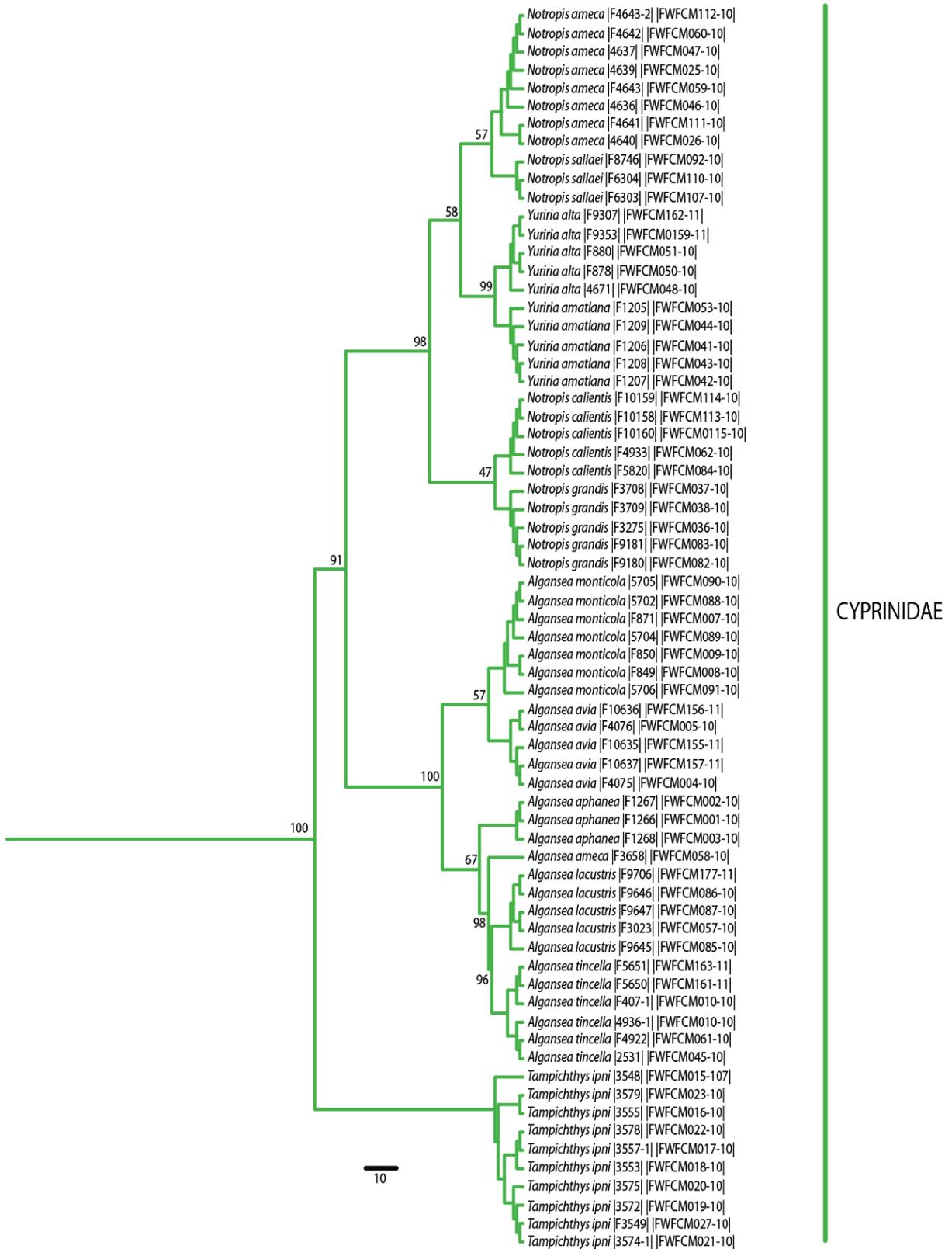


Fig. 3. Relaciones Filogenéticas de la familia Cyprinidae a través del gen mitocondrial COI.

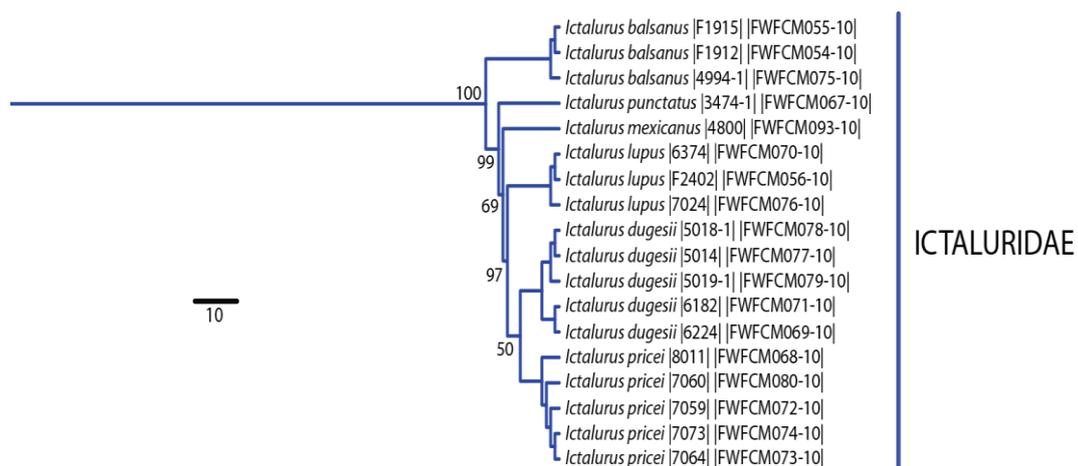


Fig. 4. Relaciones Filogenéticas de la familia Ictaluridae a través del gen mitocondrial COI

Distancias genéticas interespecíficas e interpoblacionales

Las distancias genéticas obtenidas para las diferentes poblaciones dentro de la misma especie se encuentran en un rango de $D_p = 0$ a $D_p = 1.91$. La especie que muestran la mayor variación interpoblacional es *Xenotoca eiseni*. Por su parte, la única especie que presento un valor mayor a 2% es *Xenotoca variata*, esto cuando se comparan las poblaciones de la cuenca de Cuitzeo con respecto a las poblaciones de las demás cuencas analizadas (Pánuco y Lerma).

Tabla 4. Distancias genéticas interpoblacionales (%).

CYPRINIDAE		GOODEIDAE		ICTALURIDAE	
Alganse aphanea	0.10	Alloophorus robustus	0.30	Ictalurus balsanus	0.11
A. avia	0.09	Allotoca diazi	0.63	I. dugesii	0.25
A. lacustris	0.32	A. meeki	0	I. lupus	0.42
A. monticola	0.12	Girardinichthys multiradiatus	0.36	I. pricei	0.44
A. tincella	0.09	Goodea atripinnis	0.13		
Notropis amecae	0.18	Hubbsina turneri	0		
N. calientis	0.57	Ilyodon furcidens	0.41		
N. grandis	0.76	I. whitei	0.32		
N. sallaei	0.61	Neophorus regalis	0		
Tampichthys ipni	0.09	Skiffia francesae	0		
Yuriria alta	0.77	S. lermae	0.10		
Y. amatlana	0	S. multipunctata	0		
		Xenotoca eiseni	1.08		
		X. melanosoma	0		
		X. variata	2.33		
		Zoogoneticus purhepechus	0.65		

Las distancias genéticas interespecíficas promedio dentro de la familia Goodeidae, Cyprinidae e Ictaluridae son; $D_p=3.47$, $D_p=3.46$ y $D_p= 2.68$ respectivamente. Las especie que presenta mayor divergencia con respecto a las demás dentro de cada familia son: *Hubbsina turneri* (Goodeidae), *Tampichthys ipni* (Cyprinidae) e *Ictalurus balsanus* (Ictaluridae).

Fotografías

Se tomaron fotografías de los 167 organismos secuenciados. Todos los organismos fueron colocados con vista lateral izquierda para la captura de fotografía, un ejemplo de la fotografía y los datos incluidos se muestra en la Fig. 5.

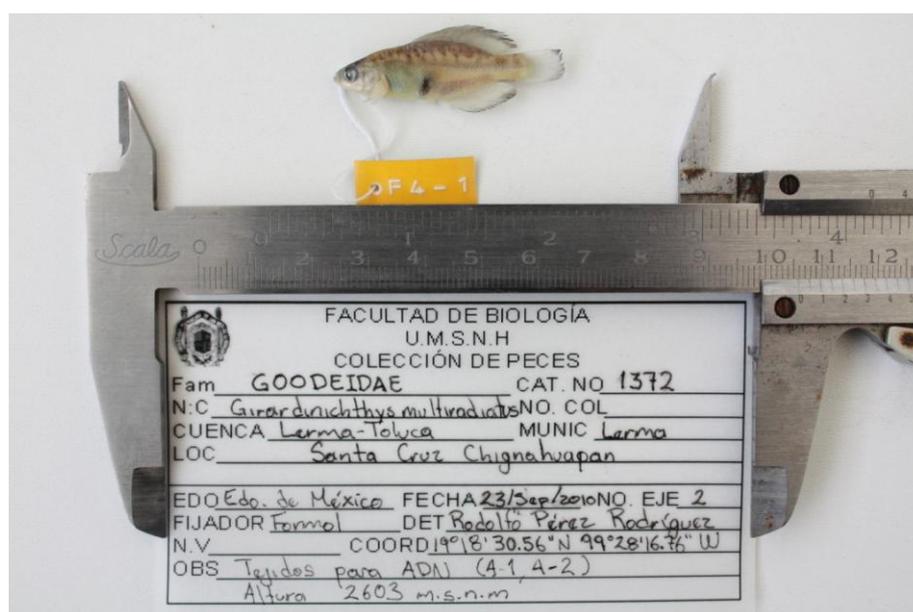


Fig. 5. Modelo de fotografía capturada para la complementación de la información del código de barras.

VI. Discusión

El gen Citocromo Oxidasa I se ha elegido por la cualidad de ser altamente conservado, no recombinar, tener un registro matrilineal y una resolución a nivel interespecífico en un alto rango de taxa (Brown, 1985). Por otro lado, su fácil obtención a través de técnicas básicas de biología moléculas ha permitido

su accesibilidad. Las 167 secuencias obtenidas de las 37 especies incluidas en el Bold representan más del 10% de las 320 especies de peces dulceacuícolas reportadas para México, lo cual es un gran avance en la inclusión de especies de peces mexicanos en el proyecto internacional del Código de Barras. Las secuencias obtenidas han permitido identificar y agrupar a nivel interespecífico la mayoría de los organismos estudiados. Sin embargo, la población de la especie *Xenotoca variata* de la familia Goodeidae que se restringe al lago de Cuitzeo presenta distancias genéticas mayores al 2%, lo cual corrobora información previa en relación a la diferenciación genética de esta población (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2011). Por otro lado, las especies *Allotoca diazi* y *A. meeki*, así como *Ilyodon whitei* e *I. furcidens* se recuperaron como linajes no monofiléticos, representando dos grupos que deben ser estudiados desde bases taxonómicas para elucidar su estatus taxonómico. De igual forma el género *Notropis* aparece como no monofilético, lo que puede ser atribuido al gen utilizado. Las relaciones filogenéticas interespecíficas corroboran la correcta identificación y el alto potencial del gen COI como herramienta para la identificación taxonómica de peces epicontinentales de México. En suma, las distancias genéticas promedio entre especies hermanas dentro de la familia Goodeidae, también se encuentra en el rango propuesto para otros genes mitocondriales, en especial el Citocromo *b* (1.7-11%; Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004), gen utilizado ampliamente para el estudio de relaciones filogenéticas y procesos biogeográficos en una amplia gama de organismos. El proceso de identificación taxonómica mediante técnicas moleculares ayudará en futuras investigaciones en el reconocimiento de nuevas especies, conocer los procesos evolutivos que han gobernado éstas especies y la relación con el lugar en que habita, además de poder realizar una aproximación de la riqueza de especies a nivel global y formar criterios amplios para su conservación.

VII. Conclusioes

El presente proyecto deja de manifiesto la relevancia que presenta el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I para la obtención de código de barras de especies animales. Aunque en su mayoría el COI sirvió adecuadamente en la identificación de la mayoría de las especies analizadas. Sin embargo, es importante reconocer que en algunos casos la delimitación de especies no está bien definida, y que bien pueden encontrarse especies

cripticas que, debido a las altas divergencias que presentan con las poblaciones identificadas como de la misma especie, no se agrupan entre si y los resultados puedan ser erróneos (como es el caso de *Xenotoca variata*), o bien que las diferencias morfológicas hagan considerarlos como dos taxones diferentes, pero que con el COI no muestren ninguna diferencia, por lo que, en estos casos, la complejidad del problema requiere de la incorporación de mas herramientas y marcadores para poder resolver de manera adecuada estos conflictos. El código de barras es una herramienta importante, pero no infalible, en la identificación de especies, sin embargo, este gen puede ser poco apropiado para entender las relaciones entre especies y la historia evolutiva de los diferentes grupos de peces estudiados.

VIII. Bibliografía

Alvarez del Villar, J. 1970. Peces Mexicanos (Claves), Secretaria de Industria y Comercio, Instituto Nacional de Investigaciones Biológico-Pesqueras y Comisión Nacional de Pesca. 166 p.

Barbur, C.D. 1973. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces:Aterinidae): A species flock from the Mexican Plateu. COPEIA 1973: 533-556.

Brown, W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. Molecular Evolutionary Genetics, R.J. MacIntyre (ed.). New York: Plenum Press, pp. 95-130.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 1998. La diversidad biológica de México: estudio de país. CONABIO, México, D. F.

Chernoff, B., & Miller, R. R. 1986. Fishes of the *Notropis calientis* complex, whit a key to the southern shiners of Mexico. COPEIA 1:170-183.

De Buen, F. 1941. Lago de Pátzcuaro. Recientes estudios Limnológicos. Revista Geográfica, Instituto Panamericano de Geografía e Historia. 1(1) : 20-44.

Doadrio, I. & Domínguez-Domínguez, O. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b, sequence data, Molecular Phylogenetics and Evolution, 31:416-430.

Domínguez-Domínguez, O., I. Doadrio, & G. Pérez-Ponced de León. 2006. Historical Biogeography of some river basins in Central Mexico evidenced by their goodeine freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks parsimony analysis (BPA). *Journal of Biogeography* 33; 1437-1447.

Domínguez-Domínguez O., Pompa-Domínguez A. & Doadrio I. 2007. A new species of the genus *Yuriria* Jordan & Evermann, 1896 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Ameca basin of the Central Mexican Plateau. *Graellsia* , 63(2): 259-271.

Domínguez-Domínguez, O. F. Alda, G. Pérez-Ponce de León, J. L. García-Garitagotia & I. Doadrio. 2008a. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* (Beab, 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. *Evolutionary Biology*. *BMC Evolutionary Biology* 2008, 8:161.

Domínguez-Domínguez, O., R. Pérez-Rodríguez & I. Doadrio. 2008b. Morphological and genetic comparative analyses of populations of *Zoogoneticus quitzeoensis* (Bean, 1898) (Cyprinodontiformes:Goodeidae) from central Mexico, with description of a new species, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79: 373-383.

Domínguez-Domínguez O., Pérez-Rodríguez R., Escalera-Vázquez L. H. & Doadrio I. 2009. Two new species of the genus *Notropis* Rafinesque, 1817 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Lerma River Basin in Central Mexico. *Hidrobiológica*. 19: 159:172.

Domínguez-Domínguez, O., C. Pedraza-Lara, N. Gurrola-Sánchez, R. Pérez-Rodríguez, I.

Guzmán, A. F. 1994. Osteología y variación no geográfica de la suspensión de la aleta anal de *Goodea luitpoldi*, (Osteichthyes : Goodeidae). *Universidad, Ciencia y Tecnología*. Vol. 3 (2):33-41.

Fitzsimons, J.M. 1972. A revision of two genera of goodeid fishes from the mexican plateau. *COPEIA*. 4:729-756.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R., (1994). DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit From Diverse Metazoan Invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3 (5), 294–299.

Groombridge, B. & M. Jenkins. 1998. Freshwater biodiversity: a preliminary global assessment. UNEP and World Conservation Monitoring Centre. World Conservation Press, Cambridge, UK.

Hubbs, C.L. & Turner, C.L. 1939. Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. XVI. A revision of the goodeidae. *Ann Arbor University of Michigan Press*. 80 p.

Israde-Alcántara, V. H. Garduño-Monroy, I. Doadrio, G. Pérez-Ponce de

León y D. R. Brooks. 2011. Historical biogeography of the Goodeinae (Cyprinodontiforms). in Uribe-Aranzabal, M. C. and H. Grier, editors. Viviparous fishes II. New Life Publications, Florida. En prensa.

Ivanova, V. N., Zemlak, S. T., Hanner, H. R. & Hebert, D. N. P. (2007). Universal Primer Cocktails for Fish DNA Barcoding. *Molecular Ecology Notes*. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x

Johns, G. C. & Avise, J. C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15:1481-1490.

Jordan, D. S., & Evermann, B. W. 1896-1900. The Fishes of North and Middle American Bulletin. United State Natural Musseum. 47:3313.

Lyons J., & N. Mercado-Silva. 2004. *Notropis calabazas* (Teleostei; Cyprinidae): New Species from the Río Pánuco Basin of Central México. *Copeia* 4: 868–875.

Meek, S. E. 1902. A Contribution to the ichthyology of México, Field Columbia Museum Publications. 65 (Zoology) 3(6):63-128

Mendoza, G. 1956. Adaptations during gestation in the viviparous teleost *Hubbsina turneri*. *Journal of Morphology*. 99(1):73-89.

Meyer M. K., Radda A. C., & Domínguez-Domínguez O. 2001. Notes on the genera *Neophorus* Hubbs and Turner, 1937 and *Allotoca* Hubbs and Turner, 1937, whit a description of a new species of *Allotoca* from Laguna de Zacapu, Michoacán, México (Teleostei, Ciprinodontiformes:Goodeidae), *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 103: 453-460.

Miller, R.R. & Fitzsimons, J.M. 1971. *Ameca splendens*, a new genus and species of goodeid fish from western Mexico, with remarks on the classification of the Goodeids. *COPEIA* 1:1-13.

Miller, R. R. W. L. Minckley & S. M. Norris. 2005. Freshwater fishes of México. University of Chicago Press. 625p

Ornelas-García, C. P. Domínguez-Domínguez, O. & Doadrio, I. 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actynopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*. 8: 340.

Parenti, L. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin American Musseum of Natural History*. 168 (4):335-557.

Pérez-Rodríguez, R. G. Pérez-Ponce de León, O. Domínguez- Domínguez & I. Doadrio. 2009. A new species of the genus *Algansea* Girard, 1856 (Actinopterygii: Cyprinidae) from the Ameca River basin, in Central Mexico.

Revista Mexicana de Biodiversidad. 80: 483- 490.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2da edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Schönhuth, S., De Sostoa, A., Martínez E., & Doadrio I. 2000. Southern Mexican minnows of the genus *Notropis* (Actinopterygii, Cyprinidae): genetic variation, phylogenetic relationships and biogeographical implications. Biochemical

Schönhuth, S., & Doadrio, I. 2003. Phylogenetic relationships of Mexican minnows of the Genus *Notropis* (Actinopterygii, Cyprinidae) Biological Journal of the Linnean Society. 80:323-337

Schönhuth, S. Doadrio, I., Domínguez-Domínguez, O., Hillis, D., and Mayden, R. L. 2008 Molecular evolution of Southern North American Cyprinidae (Actinopterygii), with the description of the new genus *Tampichthys* from central Mexico. Molecular Phylogenetics and Evolution. 47: 729-756.

Valdez-Moreno M, Ivanova NV, Elías-Gutiérrez M, Contreras-Balderas S, & Hebert PD. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. Journal of Fish Biology. 74(2):377-402.

Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R. & Hebert P. D.N. (2005). DNA Barcoding Australia's Fish Species. Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 360, 1847–1857.

Webb, S. A. Graves, J. A. Macias-Garcia, C. Magurran, A. E. Foighil, D. O. & Ritchie, M. G. (2004). Molecular Phylogeny of The Livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution, 30:527-544.