

Informe final* del Proyecto HB038
Genotipificación de especies de la ictiofauna del Sistema Pánuco-Tamesí a través de la generación del código de barras de ADN mitocondrial

Responsable: Dr. Héctor Mejía Guerrero
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 Tomas,
México D.F. 11340 México
Correo electrónico: hmejiag@ipn.mx
Teléfono/Fax: 5729 6300 ext. 62395 Fax: 5729 6300 ext. 62418
Fecha de inicio: Septiembre 15, 2009
Fecha de término: Octubre 28, 2011
Principales resultados: Base de datos, informe final, códigos de barras, fotografías
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Mejía, O., Soto-Galera, E., León-Romero Y. y C. Vargas-Mendoza. 2012. Genotipificación de especies de la ictiofauna del Sistema Pánuco-Tamesí a través de la generación del código de barras de ADN mitocondrial". Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto HB038.** México D.F.

Resumen:

El sistema Panuco-Tamesí es uno de los complejos hidrológicos más importantes de México, siendo una zona de transición entre la región Neártica y la Neotropical con una gran cantidad de taxa endémicos. A pesar de lo anterior, este sistema está catalogado como uno de los más contaminados del país. En este sentido el objetivo del presente estudio es estudiar algunas de las especies más representativas de la ictiofauna de esta región a través de la caracterización de un fragmento de 650 pb del COI. De esta forma se genotipificarán e incorporarán al sistema Internacional de Secuencias del Código Genético conocido como BOLD a 28 especies de peces del sistema Panuco-Tamesí, cifra que representa más del 50% de la diversidad total del sistema y el cual colaborará a aumentar el conocimiento de una zona importante en términos de diversidad y conservación.

-
- * 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.

Informe final del proyecto HB038

“Genotipificación de especies de la ictiofauna del Sistema Pánuco-Tamesí a través de la generación del código de barras de ADN mitocondrial”

Responsable:

Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero

Laboratorio de Variación Biológica y Evolución

Departamento de Zoología

ENCB-IPN

Participantes:

Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza

Laboratorio de Variación Biológica y Evolución

Departamento de Zoología

ENCB-IPN

M. en C. Eduardo Soto Galera

Laboratorio de Ictiología

Departamento de Zoología

ENCB-IPN

CONTENIDO

Resumen	1
Objetivos	1
Material y método	2
Resultados	7
Discusión	12
Conclusiones	17
Anexo	17
Literatura citada	18

Resumen: El sistema Panuco-Tamesí es uno de los complejos hidrológicos más importantes de México, siendo una zona de transición entre la región Neártica y la Neotropical con una gran cantidad de taxa endémicos. A pesar de lo anterior, este sistema está catalogado como uno de los más contaminados del país. En este sentido el objetivo del presente estudio fue estudiar algunas de las especies más representativas de la ictiofauna de esta región a través de la caracterización de un fragmento de 650 pb del COI. De esta forma se incorporaron al sistema Internacional de Secuencias del Código Genético conocido como BOLD 285 ejemplares de 34 especies de peces del sistema Panuco-Tamesí. En lo referente a la genotipificación se generaron 181 códigos de barra de ADN de 32 de las 34 especies incorporadas al sistema BOLD: Los resultados encontrados en este estudio establecen que el código de barras de ADN es una buena herramienta para la determinación taxonómica a nivel de género, sin embargo, en la determinación taxonómica a nivel de especie existen algunos problemas con los géneros *Herichthys* y *Xiphophorus*.

Objetivo General: Caracterizar un fragmento de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa (COI) del ADN mitocondrial de especies de la Ictiofauna del sistema Panuco-Tamesí para su incorporación al sistema Barcode

Objetivos Particulares:

-Colectar e identificar ejemplares de peces provenientes del sistema Panuco-Tamesí

- Tomar fotografías de cada uno de los ejemplares e incorporarlos a la colección nacional de peces dulceacuícolas mexicanos
- Secuenciar un fragmento de la Citocromo Oxidasa I del ADN mitocondrial
- Incorporar la información generada al sistema BOLD

Material y Método

Colecta e identificación del material biológico

Las colectas se realizaron en 31 localidades diferentes del sistema Pánuco-Tamesí provenientes de los estados de San Luis Potosí, Tamaulipas, Hidalgo, Veracruz , Querétaro y Estado de México (figura 1).



Figura 1. Localidades de colecta dentro del Sistema Pánuco-Tamesí utilizadas en este proyecto

Los peces fueron fijados en campo en alcohol al 70% para su transporte al laboratorio. El M. en C. Eduardo Soto Galera (curador de la colección de peces dulceacuícolas de la ENCB-IPN) identificó 34 especies distintas (*Agonostomus monticola*, *Algansea tincella*, *Ataeniobius toweri*, *Cualac tessellatus*, *Cyprinella lutrensis*, *Dormitator maculatus*, *Dorosoma cepedianum*, *Gambusia affinis*, *G. aurata*, *G. panuco*, *G. regani*, *G. vittata*, *Gobiomorus dormitor*, *Herichthys bartoni*, *H. cyanoguttatus*, *H. labridens*, *H. pantostictus*, *H. steindachneri*, *H. tamasopoensis*, *Heterandria jonesii*, *Ictalurus mexicanus*, *Notropis tropicus*, *Poecilia latipunctata*, *P. mexicana*, *Poeciliopsis gracilis*, *Tampichthys dichromus*, *T. erimyzonops*, *T. ipni*, *Xiphophorus birchmani*, *X. cortezi*, *X. montezumae*, *X. nezahualcoyotl*, *X. pygmaeus* y *X. variatus*) provenientes de 9 familias y 6 ordenes.

Envió de datos al sistema BOLD

El proyecto fue registrado en el consorcio barcode con el título “**Freshwater fishes of the Panuco-Tamesi system**” con el código FFPTR. Un total de 285 individuos fueron seleccionados para la generación del código de barras de ADN mitocondrial, los cuales fueron preservados en alcohol, fotografiados individualmente e incorporados a la colección de peces dulceacuícolas (ver anexo en CD).

Obtención de muestras de tejido y extracción de ADN

A cada uno de los ejemplares se les retiro una porción de músculo del lado izquierdo del cuerpo los cuales fueron colocados en viales con alcohol al 70%.

Una pequeña porción de la muestra extraída a cada pez fue utilizada para la extracción de ADN mediante el protocolo de extracción con sales de Aljanabi y Martínez(1997), la calidad y cantidad del ADN fue buena para su posterior amplificación.

Amplificación de ADN

Un fragmento de aproximadamente 650 pb de la Citocromo oxidasa I mitocondrial logro ser amplificado con los iniciadores F1 y R1 diseñados por Ward *et al.* (2005), las condiciones de reacción utilizadas en un volumen final de 25 ul fueron las siguientes (Figura 2):

Buffer de reacción para PCR 1X

Trealosa 5%

Cloruro de Magnesio 2.5mM

Mezcla de dntp's 100 μ M

Primer F1 0.1 μ M

Primer R1 0.1 μ M

Taq Polimerasa 1U

ADN entre 50 y 100 ng

El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial 96° 3 minutos

De 30 a 35 ciclos de amplificación consistentes en:

Desnaturalización 94° C 30 segundos

Alineamiento 54°C 30 segundos

Polimerización 72°C 1 minuto

Extensión final 72°C 10 minutos

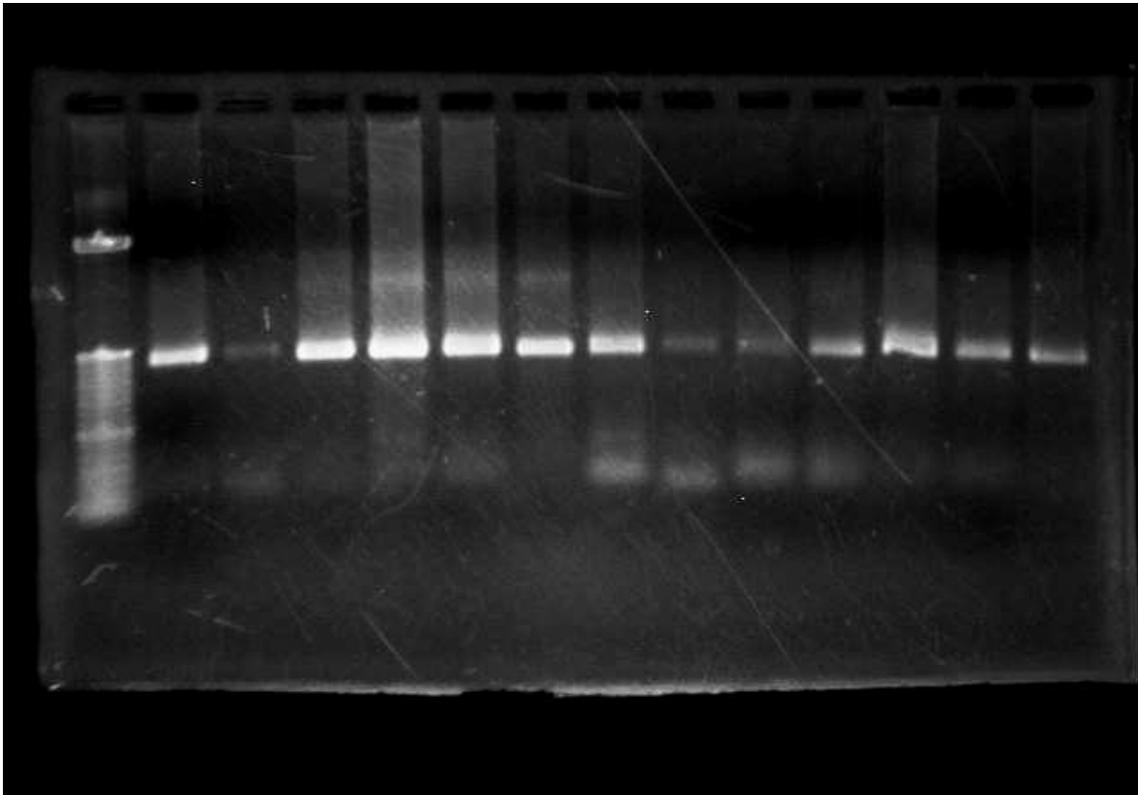


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de un fragmento de aproximadamente 650 pb de la Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial. de izq. a der. carril 1 marcador de talla molecular ladder 50, carriles 2 a 14: individuos.

Secuenciación de ADN

Se mando a secuenciar una placas conteniendo 94 muestras de amplificados las cuales fueron secadas en una estufa. De las 94 muestras enviadas se pudo obtener el código de barras sólo de 15 de ellas con una calidad muy baja. Posteriormente y con base en las recomendaciones recibidas por parte de la Dra. Natalia Ivanova se envió una segunda placa con 95 muestras las cuales fueron deshidratadas en un desecador. En este caso se pudo generar el código de barras de 59 de ellas, donde la longitud de las secuencias generadas oscilo entre 145 y 652 pares de bases. El bajo rendimiento en la calidad y longitud de las secuencias obtenidas fue producto de la variación que existe entre la cantidad de amplificado en cada uno de los pozos de la placa. Partiendo de lo anterior, el personal adscrito a la universidad de Guelph nos conmino a enviar muestras de tejido en lugar de productos de PCR ya que supuestamente ellos tenían los protocolos bien estandarizados para procesar las muestras y generar los códigos de barra. Se enviaron dos placas con 95 muestras (190 en total), de las cuales se logró generar el código de barras de ADN de 107 de ellas, donde la longitud de las secuencias generadas oscilo entre 318 y 652 pares de bases. En total, se lograron obtener 181 códigos de barra de 32 de las 34 especies enviadas, no pudiéndose obtener resultados satisfactorios para las especies *Dorosoma cepedianum* y *Notropis tropicus*.

Resultados

Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas con ambos iniciadores fueron conciliadas y editadas para posteriormente ser alineadas en el programa Clustal X (Thompson *et al.* 1994). En virtud de que la longitud de las secuencias no fue la misma los huecos insertados por el programa Clustal X fueron substituidos e incorporados como datos perdidos (?). El archivo de alineamiento de los 181 códigos de barra fue incorporado al programa DAMBE(Xia y Zia 2001) para realizar un dendrograma de las secuencias mediante el método del vecino más cercano (Saitou y Nei 1987) utilizando el modelo de substitución de dos parámetros de Kimura (2KP) (Kimura 1980).

Dendrogramas e identificación taxonómica de los ejemplares

El primer dendrograma se construyó con la totalidad de los 181 códigos de barra; el árbol recuperado permitió recuperar a todos los géneros como unidades discretas con la excepción de la secuencia FFPTR184 de *Cualac tessellatus* que es recuperada en el grupo del género *Herichthys* y la secuencia FFPTR239 que pertenece a *Cyprinella lutrensis* que se inserta en el grupo de *Tampichthys ipni* (Figura 3 ver Anexo). Cabe mencionar que hay secuencias que resultan ser idénticas, tal es el caso de muchos ejemplares del género *Herichthys*. En un análisis posterior fueron eliminadas las secuencias anómalas de *Cualac tessellatus* y *Cyprinella lutrensis*, además de que las secuencias idénticas fueron fusionadas en una sola (Figura 4).



Figura 4. Dendrograma de NJ que muestra la relación genética entre los ejemplares analizados en este proyecto construido mediante el modelo 2KP

Posteriormente se realizaron análisis particulares para los grupos mayores representados en este estudio con la finalidad de poder evaluar la efectividad de la herramienta Barcode en la determinación taxonómica de las especies.

Orden Cyprinodontiformes

El orden de los Cyprinodontiformes está representado en este estudio por las familias Poeciliidae y Cyprinodontidae. El dendrograma que muestra las relaciones entre los miembros de este grupo indica que el código de barras de ADN no permite distinguir entre algunos de los individuos de *Xiphophorus montezumae* y *Xiphophorus nezahualcoyotl*, los cuales muestran haplotipos idénticos o son recuperados en el mismo grupo (Figura 5). En el caso de los ejemplares de *Xiphophorus nezahualcoyotl* procedentes del municipio de Ocampo, Tamaulipas (PTR 93 a PTR98) estos son recuperados en un grupo, mientras que los ejemplares procedentes del Río Tamasopo (FFPTR 249 y FFPTR 252) son recuperados en el grupo de *Xiphophorus montezumae* que fueron colectados en el Río Gallinas.

Orden Cypriniformes

El orden Cypriniformes sólo está representado por la familia Cyprinidae, incluyendo a los géneros *Tampichthys* y *Algansea*. En este caso el código de barras de ADN no tiene problemas en discriminar a las distintas especies, las cuales son recuperadas como grupos monofiléticos (Figura 6).

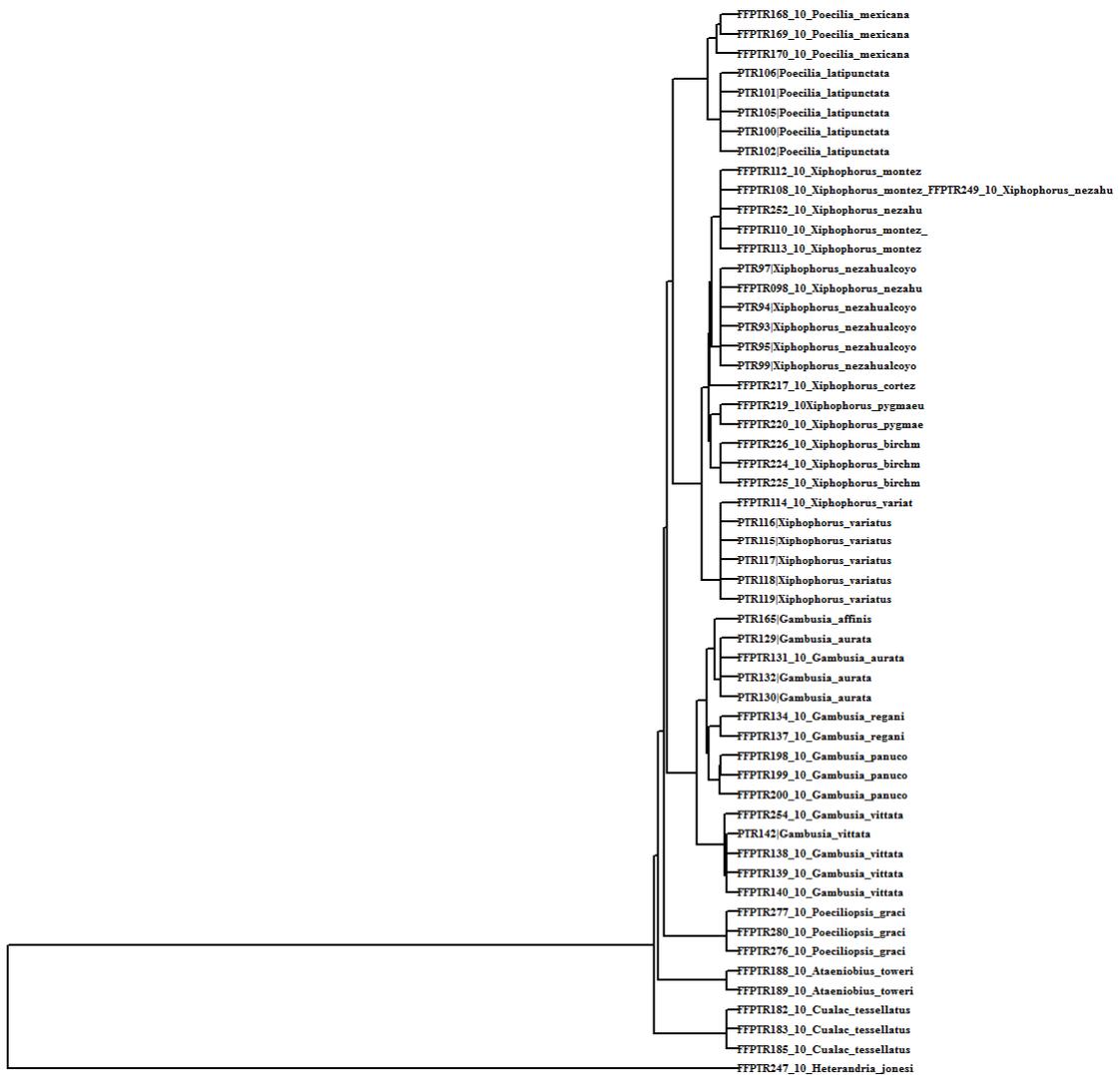


Figura 5. Dendrograma de NJ que muestra la relación genética entre los ejemplares pertenecientes al orden Cyprinodontiformes

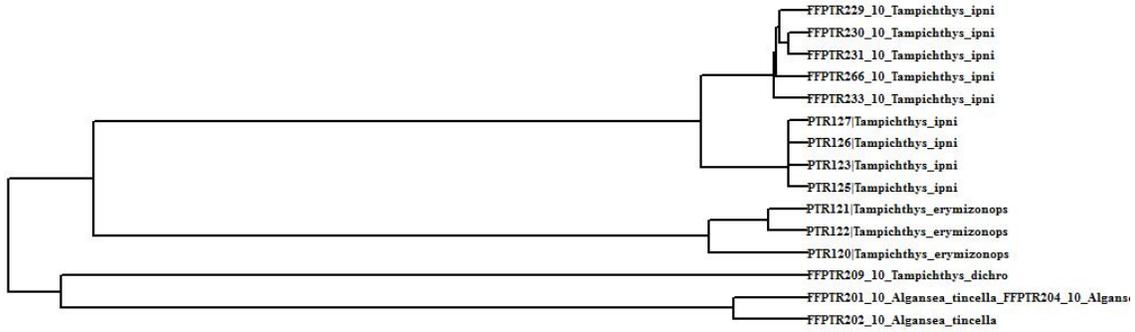


Figura 6. Dendrograma de NJ que muestra la relación genética entre los ejemplares pertenecientes al orden Cypriniformes

Género *Herichthys*

El caso del género *Herichthys* es uno de los que más llama la atención dada la dificultad que existe para la identificación taxonómica de sus especies partiendo de caracteres tradicionales. En este sentido, considerábamos que el código de barras de ADN permitiría una identificación precisa de los ejemplares, sin embargo, no fue así. Sólo *Herichthys steindachneri* y *Herichthys tamasopoensis* son recuperados como grupos monofiléticos. *Herichthys bartoni* es recuperado como un grupo parafilético por la incorporación de dos haplotipos de *Herichthys labridens*, finalmente *Herichthys cyanoguttatus*, *Herichthys pantostictus* y *Herichthys labridens* son recuperados como grupo polifiléticos, lo cual sugiere la existencia de un complejo de especies (Figura 7).

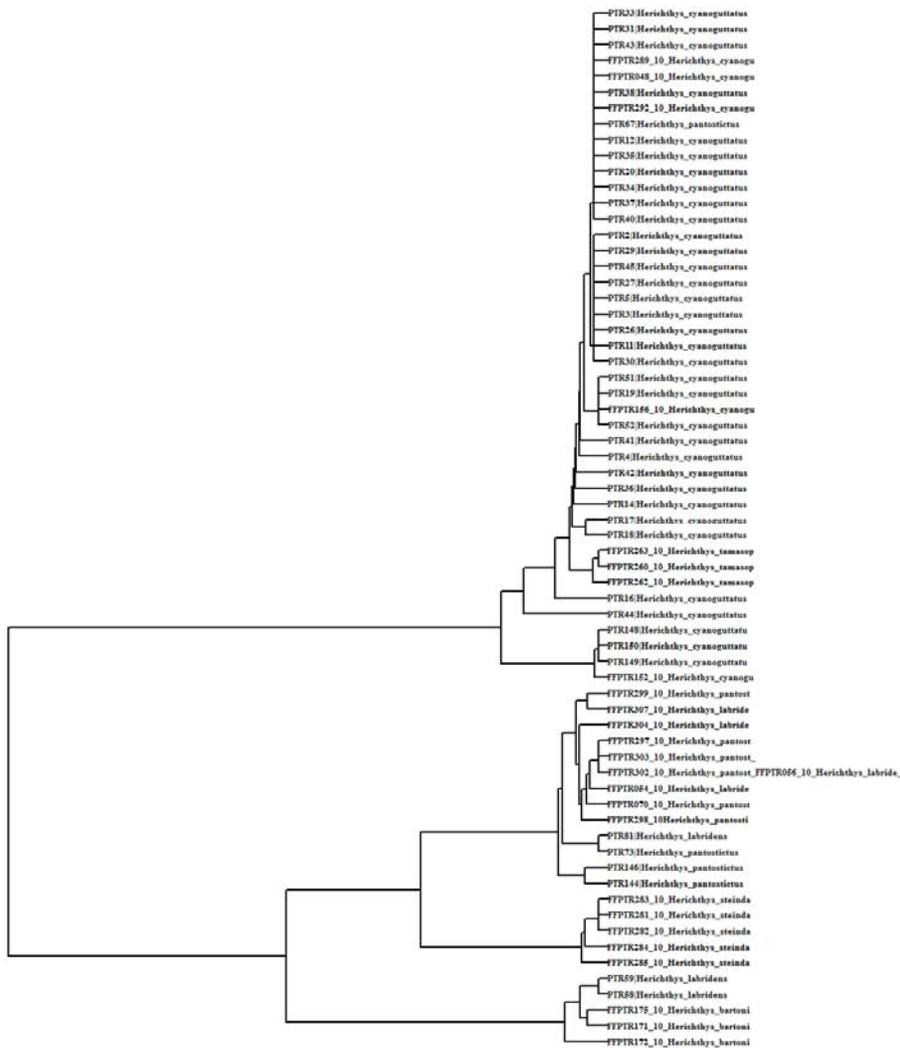


Figura 7. Dendrograma de NJ que muestra la relación genética entre las especies del género *Herichthys*

Discusión

Los resultados de este estudio contrastan con los que han sido encontrados en trabajos anteriores. Por ejemplo, Valdez-Moreno *et al.* (2009) reportan que cerca del 93% de las especies nominales incorporadas en su estudio son bien discriminadas por el código de barras. En este mismo sentido, Hubert *et al.* (2008) reportan valores similares. En este estudio, el código de barras de ADN permitió discriminar sólo el 75% de las muestras previamente catalogadas como especies

diferentes (24 de las 32 especies analizadas), ya que 4 de las especies incorporadas en este estudio comparten haplotipos entre sí (*Herichthys pantostictus* y *Herichthys labridens*) (*Xiphophorus nezahualcoyotl* y *Xiphophorus montezumae*); además de la incorporación de *Cyprinella lutrensis* en el grupo de *Tampichthys ipni*, la secuencia idéntica de un haplotipo de *Cualac tessellatus* con *Herichthys bartoni* y la polifilia de *Herichthys cyanoguttatus*. Una vez que se eliminaron las secuencias anómalas (haplotipo FFPTR184 de *Cualac tessellatus* y haplotipo FFPTR239 de *Cyprinella lutrensis*) y se analizaron los grupos particulares para eliminar la posibilidad de estar incorporando secuencias muy divergentes y posiblemente saturadas la identificación satisfactoria se incremento al 80% (25 de las 31 especies incorporadas). Hubert *et al.* (2008) sugieren tres posibles escenarios que pueden conducir a una mala determinación taxonómica:

- 1) El establecimiento de monofilia recíproca entre dos especies hermanas es en función de tiempo determinada por la fijación de un coalescente desde la línea de descendencia
- 2) Los taxa pueden compartir polimorfismo producto de introgresión.
- 3) Las especies que comparten el mismo código de barras pueden representar una misma especie. En el caso de las especies del género *Xiphophorus* no es de extrañar que el haplotipo compartido sea producto del mantenimiento de un polimorfismo ancestral, ya que de acuerdo con la filogenia del grupo propuesta por Basolo (1991) *Xiphophorus nezahualcoyotl* y *Xiphophorus montezumae* son especies hermanas. En el caso de las mojarras del género *Herichthys* la explicación no es tan simple. Contrario a lo encontrado por Valdez-Moreno *et al.* (2009) quienes no tuvieron problemas para discriminar entre las especies de

cíclidos utilizadas en su estudio, en el presente estudio sólo 2 de las 6 especies del género *Herichthys* fueron recuperadas como monofiléticas. Estudios filogenéticos previos realizados por Hulsey *et al.* 2004 y Concheiro-Pérez. *et al.* 2007 permiten recuperar al género *Herichthys* como un grupo monofilético, en la filogenia construida por Hulsey *et al.* (2004) *H. labridens* se encuentra relacionada por un lado con *H. bartoni* y por el otro con *H. steindachneri* y *H. pantostictus*. Mientras que, en la filogenia construida por Concheiro-Pérez *et al.* (2007) *H. labridens* aparece relacionada con *H. bartoni* en una rama y en la otra con *H. carpintis*, *H. tamasopoensis* y *H. deppii*. Cabe mencionar que estos resultados deben ser tomados con reserva ya que ninguno de los dos estudios incluyó las 9 especies reconocidas para el género, además, la inclusión de grupos filogenéticamente alejados podría promover la saturación en las sustituciones nucleóticas conduciendo a resultados equivocados. En virtud de lo anterior, se reanalizaron las secuencias depositadas en el Genbank para el género *Herichthys* junto con las secuencias de los posibles grupos hermanos recuperados en las filogenias moleculares (Hulsey *et al.* 2004, Concheiro-Pérez. *et al.* 2007) a través de un análisis por parsimonia (Figura 8). Ambos análisis produjeron resultados similares, el género *Herichthys* es recuperado como un grupo monofilético que incluye dos grandes grupos: el grupo de especies asociadas a *Herichthys cyanoguttatus* (*H. cyanoguttatus*, *H. deppii*, *H. minckleyi*, *H. carpintis* y *H. tamasopoensis*) y el grupo de especies asociadas a *Herichthys bartoni* (*H. bartoni*, *H. labridens*, *H. steindachneri* y *H. pantostictus*). En este sentido, también es de llamar la atención la polifilia de los distintos haplotipos de *H. labridens*.

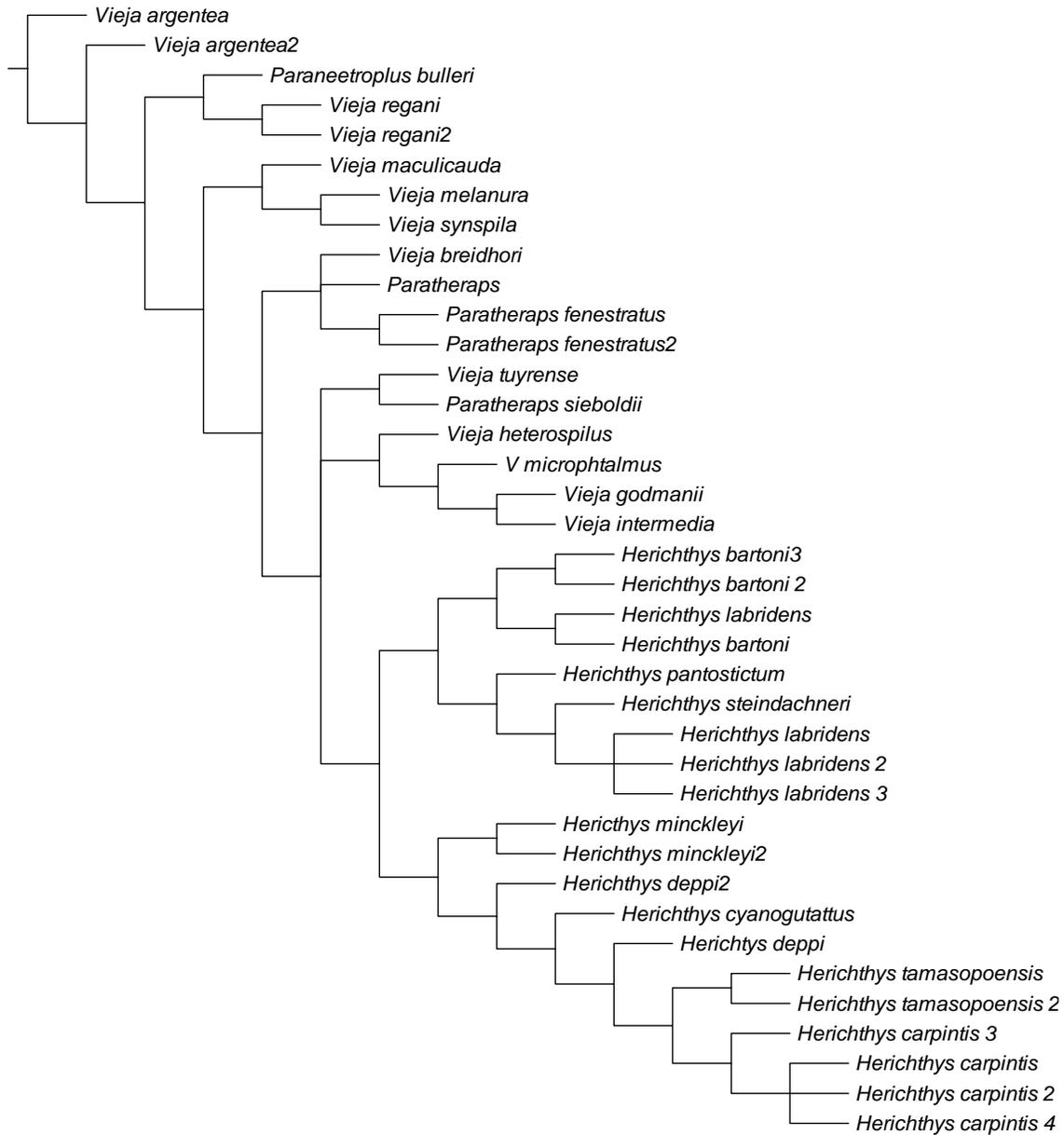


Figura 8. Árbol filogenético de consenso estricto construido mediante un análisis de parsimonia de las secuencias moleculares del género *Herichthys* depositadas en el Genbank.

Las especies del grupo *H. bartoni* incluyen una especie de amplia distribución (*H. labridens*) y tres especies de distribución restringida (*H. bartoni*, *H. steindachneri* y *H. pantostictus*). La compleja relación taxonómica de las especies del grupo *H. bartoni* ya había sido sugerida inicialmente por otros autores. Por ejemplo, Taylor y Miller (1983), describen a los morfos de *Herichthys labridens* de distintas

localidades como una sola especie con variaciones geográficas. Ellos establecen que las distintas formas del complejo *labridens* exhiben rasgos característicos comunes como son: una mancha con tono rojo a púrpura justo detrás de las aletas pectorales, una boca pequeña y subterminal en donde el labio superior está ligeramente proyectado hacia abajo. De acuerdo con Taylor y Miller (1983) *Herichthys labridens* se encuentra ampliamente distribuida en la cuenca del Río Pánuco, sin embargo, Miller *et al.* (2005) en un trabajo posterior establecen que esta especie está restringida a la cabecera del Río Verde y que el resto de las localidades podrían corresponder a una nueva especie no descrita hasta el momento. Adicionalmente, *H. labridens* presenta una extensa variación geográfica en caracteres morfométricos y merísticos, así como en el patrón de coloración. En algunas localidades se ha encontrado en simpatria con *H. steindachneri* y *H. bartoni*. La divergencia nucleotídica promedio entre las secuencias del género *Herichthys* utilizadas en este estudio es de 3.8%, sin embargo, existen individuos de *H. pantostictus* con haplotipos idénticos a los presentes en *H. labridens*, así como individuos que muestran valores de divergencia menores al umbral del 1% para ser consideradas como especies verdaderas (Ver matriz de comparaciones pareadas en el anexo). Resultados similares han sido encontrados recientemente en el complejo de especies del género *Amphilopus*, en donde especies diferentes comparten haplotipos mitocondriales, así como alelos en loci de microsatélites, lo cual sugiere una especiación muy reciente (Barluenga y Meyer 2010, Elmer *et al.* 2010, Geiger *et al.* 2010), situación que pudiera estar ocurriendo en el género *Herichthys* y que requiere de un proceso de revisión taxonómica del grupo.

Conclusiones

- Se colectaron e identificaron 34 especies de la ictiofauna en 31 localidades del sistema Pánuco-Tamesí.
- Un total de 285 individuos fueron incorporados al sistema BOLD.
- Se obtuvieron secuencias de 181 individuos pertenecientes a 32 especies de la ictiofauna del sistema Pánuco-Tamesí.
- La herramienta BOLD permitió la identificación de los linajes al 100% a nivel de género, pero sólo logro discriminar 80% a nivel específico.
- Los resultados encontrados en este estudio sugieren que el género *Herichthys* puede comprender un grupo de especies como ha sido reportado para otros grupos de cíclidos.

Anexo

En un dispositivo electrónico (CD) se incorporo la siguiente información:

- Datos de colecta de los 285 ejemplares que fueron incorporados al sistema BOLD, incluyendo, número de catálogo de los ejemplares en la colección (información del voucher), clasificación taxónomica del espécimen, nombre, correo electrónico e institución del investigador que hizo la identificación taxonómica, detalles del espécimen e información relacionada con los datos de colecta tales como colector, fecha de la colecta, localidad exacta, coordenadas geográficas en grados decimales y altitud snm.
- Fotografías en vista lateral de cada uno de los 285 ejemplares incorporados al sistema BOLD incluyendo la longitud patrón.

- Electroferogramas con los dos iniciadores de cada una de las 181 secuencias generadas en este estudio.
- 181 secuencias conciliadas y editadas en formato fasta
- 181 secuencias alineadas en el programa Clustal X
- Figuras en formato tiff de los árboles filogenéticos reportados en este estudio
- Matriz de distancias pareadas entre las secuencias del género *Herichthys*

Literatura citada

Aljanabi, S.M. e I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**: 4692-4693.

Barluenga, M. y A. Meyer. 2010. Phylogeography, colonization and population history of the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* spp.) in the Nicaraguan crater lakes. *BMC Evolutionary Biology* **10**:326

Basolo, A.L.1991. Male swords and female preferences. *Science* 253: 1426-1427.

Concheiro-Pérez, G., L. Oldlich, G. Ortí, E. Birmingham, I. Doadrio, R. Zardoya. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome *b* gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**: 91–110.

Elmer, K.R., T.K. Lehtonen, A.F. Kautt, C. Harrod y A. Meyer. 2010. Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times. *BMC Biology* **8**:60.

Geiger, M.F., G.K. McCrary y U.K. Schliwen. 2010. Not a simple case – A first comprehensive phylogenetic hypothesis for the Midas cichlid complex in Nicaragua (Teleostei: Cichlidae: *Amphilophus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**: 1011-1024.

Hubert, N., R.Hanner, E.Holm, N.E. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April y L. Berntachez. 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* **3**: e2490.

Hulseay C., F. García de León, Y. Sanchez, D. Hendrickson y T. Neara. 2004. Temporal diversification of Mesoamerican cichlid fishes across a major biogeographic boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 754–764.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.

Miller R., W. Minckley y S. Norris. 2005. Freshwater fishes of Mexico.. University of Michigan. 490 pp.

Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.

Taylor J. y R. Miller. 1983. Cichlid fishes (Genus *Cichlasoma*) of the Rio Pánuco basin, Eastern México, with description of a new species. *Occasional papers of the museum of Natural History. The University of Kansas*. **104**: 1-24.

Thompson, J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.

Valdez-Moreno, M., N.V. Ivanova, M. Elías-Gutiérrez, S. Contreras-Balderas y P.D.N. Hebert. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* **74**: 377-402.

Ward, R. D., T. S Zemplak, B.H. Innes, P.R. Last & P. D. N Hebert,. 2005 DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* **360**: 1847-1857.

Xia, X. y Z. Xia. 2001. Dambe: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**: 371-373