

*Para Sara y Ramón*



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Ciencias Biológicas

“Análisis filogeográfico del pez blanco *Chirostoma humboldtianum*  
(Valenciennes, 1835) (Pisces: Atheriniformes: Atherinopsidae)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. Rosa María García Martínez

Cotutores:

Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa

Dr. Francisco Javier García de León

Asesor:

Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.**

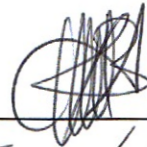
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Rosa María García Martínez

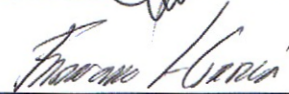
El día 09 de Febrero de 2015

Jurado:


Dr. Irene de los Ángeles Barriga Sosa (Presidenta)



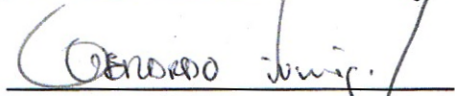
Dr. Francisco Javier García De León (Secretario)



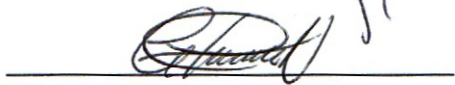
Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero (Vocal)



Dr. Gerardo Zúñiga Bermúdez (Vocal)



Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza (Vocal)



*COMITÉ TUTORAL*

COTUTORES DE TESIS:

**DRA. IRENE DE LOS ÁNGELES BARRIGA SOSA**

Departamento de Hidrobiología – UAM Iztapalapa

**DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA DE LEÓN**

CIBNOR LA PAZ

ASESOR:

**DR. HÉCTOR OMAR MEJÍA GUERRERO**

Departamento de Zoología – ENCB IPN

*SINODALES:*

**DR. GERARDO ZÚÑIGA BERMÚDEZ**

Laboratorio de Variación Biológica y Evolución, Departamento de Zoología, Escuela  
Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

**DR. CARLOS FABIÁN VARGAS MENDOZA**

Laboratorio de Variación Biológica y Evolución, Departamento de Zoología, Escuela  
Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

La presente investigación se realizó en:

El Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de  
Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa,  
bajo la dirección de la  
Dra. Irene D. L. A. Barriga Sosa.

Y

El Laboratorio de Genética de la Conservación del Centro de investigaciones  
Biológicas del Noroeste, S. C., bajo la dirección del  
Dr. Francisco Javier García De León.

El presente trabajo contó con los apoyos de los proyectos: SEP-Conacyt-130220 y UAM-147-09-01. La sustentante fue becaria Conacyt-224707 inscrita en el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Del presente trabajo se generaron las siguientes publicaciones:

- 1) **García-Martínez, R. M.**, O. Mejía, F. J. García De León & I. D. L. A. Barriga-Sosa. 2015. Extreme genetic divergence in the endemic fish *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835): implications or its conservation. Aceptado Hidrobiológica, Octubre 2014 (en prensa) - Anexo 1.
- 2) **García-Martínez, R. M.**, F. J. García De León, O. Mejía & I. D. L. A. Barriga Sosa, 2014. Isolation and characterization of microsatellite loci in the silverside fish *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes 1835 (Atherinopsidae: Menidiinae). Revista Mexicana de Biodiversidad-1639: (en prensa). PrintISSN 1870-3453, Online ISSN2007-8706. Impact Factor: 0.389 – Anexo 2
- 3) Barriga-Sosa I. D. L. A., **R. M. García-Martínez**, J. Díaz-Larrea, O. A. Lozano-Garza & F. J. García De León. 2014. Isolation and characterization of 26 microsatellite loci for the shortfin silverside fish *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes 1835 (Atherinopsidae: Menidiinae) derived from Next Generation Sequencing and their cross-amplification in Central Mexican Atherinopsids. Open Journal of Genetics 4: 355-361. <http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2014.45032>. PrintISSN 2162-4453. Online ISSN2162-4461. Impact Factor:0.24 (ISI Web of Knowledge) – Anexo 3.



Solo el hombre integro es capaz de confesar sus faltas y de reconocer sus errores.  
*Benjamin Franklin*

Lo que llamamos el principio es a menudo el fin y llegar al fin es llegar al comienzo.

El fin es el lugar del que partimos.

*T.S. Eliot, "Little Gidding", Cuatro cuartetos*

# DEDICATORIA

A MI ESPOSO "RAMÓN" Y A NUESTRA HIJA "SARA" POR SU AMOR,  
COMPRENSIÓN Y PACIENCIA.

QUIENES A LO LARGO DE ESTE RECORRIDO ME HAN APOYADO  
INTEGRAMENTE PARA LA CULMINACIÓN DE ESTA TESIS.

A MIS PADRES, QUIENES ME ENSEÑARON QUE EL ESFUERZO Y EL TRABAJO  
CONSTANTE SON LA LLAVE PARA ALCANZAR NUESTRAS METAS.

A MIS HERMANOS, POR TODOS LOS MOMENTOS COMPARTIDOS.

A MIS SOBRINOS, LUIS, SANDRA Y JIMENA

# AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irene Barriga Sosa, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la dirección de esta tesis y su apoyo durante este tiempo.

Al Dr. Francisco J. García De León, codirector de este proyecto, por su dirección y críticas a este trabajo, lo que contribuyó al mejoramiento del mismo.

Al Dr. Omar Mejía Guerrero, por su apoyo y amistad, por sus recomendaciones y valiosos consejos, por resolver mis dudas en todo momento y compartir sus conocimientos.

A los miembros del jurado externo, el Dr. Fabián Vargas Mendoza y el Dr. Gerardo Zúñiga Bermúdez por quienes siento un gran respeto y admiración. Por aceptar ser sinodales en este trabajo y por sus valiosos comentarios para la consolidación de esta tesis. En particular quiero agradecer al Dr. Gerardo por haberme acercado a esta área del conocimiento de la biología.

Al Dr. Manuel Arnoldo Castillo Rivera por su apoyo como representante de la Comisión del Doctorado.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana y Dra. María de Jesús Ferrara Guerrero por su apoyo como coordinadoras del Doctorado en Ciencias Biológicas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico (No. 224707)  
para el desarrollo de este trabajo

Al Biól. Ramón Cisneros Barrios por compartir sus conocimientos, por sus explicaciones y por las largas charlas que me ayudaban a consolidar mis ideas, después de tanto divagar. Por su apoyo desinteresado en la colecta del material biológico, que hizo posible la realización de esta tesis. Pero sobre todo por su amor y confianza.

A la Dra. Alejandra Serrato por su amistad y apoyo en la secuenciación.

Al Dr. Luis Guevara Chumacero por su amistad y apoyo durante todo el tiempo que he estado en la UAM.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola con quienes compartí muy buenos momentos. En especial a Irmita, por su solidaridad.

A todas aquellas personas que en este momento no vienen a mi mente, pero que en algún momento conté con su apoyo.

## ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VIII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. JUSTIFICACIÓN	7
5. MARCO TEÓRICO	9
5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	9
5.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	11
5.3 ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL GÉNERO <i>Chirostoma</i>	12
5.4 FILOGEOGRAFÍA	14
5.5 TEORÍA DE LA COALESCENCIA	16
5.6 TEORÍA NEUTRAL DE LA EVOLUCIÓN	17
5.7 EL ADN MITOCONDRIAL	18
5.7.1 Citocromo b	18
5.7.2 Región control	19
5.8 MICROSATÉLITES	20
6. ANTECEDENTES	23
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
8. HIPÓTESIS	31
9. OBJETIVOS	32

10. MATERIALES Y MÉTODOS	
10.1 RECOLECTA E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	33
10.2 EXTRACCIÓN DE ADN	34
10.3 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES MITOCONDRIALES	35
10.4 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITE	37
10.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL ADN MITOCONDRIAL	38
10.5.1 Edición y alineamiento de secuencias	38
10.5.2 Diversidad genética	38
10.5.3 Análisis genealógico	38
10.5.4 Estructura poblacional y diferenciación poblacional	40
10.5.5 Prueba de neutralidad	41
10.5.6 Análisis de la historia demográfica	42
10.5.7 Tiempos de divergencia	43
10.6 ANÁLISIS DE DATOS MICROSATÉLITALES	44
10.6.1 Equilibrio de Hardy – Weingber, desequilibrio de ligamiento y alelos nulos	44
10.6.2 Análisis de agrupamiento	45
10.6.3 Diversidad genética	46
10.6.4 Estructura poblacional	46
10.6.5 Análisis demográfico	47
11. RESULTADOS	49

11.1 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE REGIONES MITOCONDRIALES	49
11.1.1 Alineamiento de las secuencias	49
11.1.2 Diversidad genética	49
11.1.3 Análisis genealógico	51
11.1.4 Estructura genética y diferenciación poblacional	57
11.1.5 Prueba de neutralidad	60
11.1.6 Análisis de la historia demográfica	61
11.1.7 Tiempos de divergencia	69
11.2 ANÁLISIS DE MICROSATELITES	70
11.2.1 Equilibrio de Hardy – Weingber, desequilibrio de ligamiento y alelos nulos	71
11.2.2 Análisis de agrupamiento	72
11.2.3 Diversidad genética	73
11.2.3 Estructura poblacional	75
11.2.4 Historia demográfica	76
12. DISCUSIÓN	79
13. CONCLUSIÓN	88
14. LITERATURA CITADA	89
15. ANEXOS	
15.1 ANEXO 1	103
15.2 ANEXO 2	138
15.3 ANEXO 3	141

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de los tres dominios de la Región control del ADN mitocondrial (tomado de Avise 2000).

Figura 2. Mapa que muestra las localidades de recolecta de *Chiostoma humboldtianum*.

Figura 3. Filograma de consenso de mayoría del análisis Bayesiano del citocromo b y región control concatenados de *Chiostoma humboldtianum* en la región central de México. Se muestran los valores de probabilidad posterior en decimales para los clados principales y posterior a la diagonal los valores de bootstrap. Las abreviaturas corresponden a los individuos para cada localidad geográfica: T = Tiacaque, VV = Presa Villa Victoria, Z = Laguna de Zacapu, SJ = Presa San Juanico, SP = Laguna de San Pedro.

Figura 4. Red de haplotipos construida a partir del método de median-network para el citocromo b a partir de 43 haplotipos de *Chiostoma humboldtianum* de la región central de México. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas diagonales representan el número de mutaciones entre haplotipos. Los colores representan a cada una de las localidades geográficas, Tiacaque (T) en naranja, Presa Tepuxtepec (Tx) en violeta, Presa Villa Victoria (VV) en azul, Laguna de Zacapu (Z) en verde, Laguna de San Juanico (SJ) en gris y Laguna de San Pedro Lagunillas (SP) en rojo. Las abreviaturas son solo para darles un nombre putativo a cada haplotipo.



Figura 5. Red de haplotipos construida a partir de del método de median-network para la región control a partir de 60 haplotipos de *Chirostoma humboldtianum*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas diagonales representan el número de mutaciones entre haplotipos. Los colores representan a cada una de las localidades geográficas, Tiacaque (T) en naranja, Presa Tepuxtepec (Tx) en violeta, Presa Villa Victoria (VV) en azul, Laguna de Zacapu (Z) en verde, Laguna de San Juanico (SJ) en gris y Laguna de San Pedro Lagunillas (SP) en rojo. Las abreviaturas son solo para darles un nombre putativo a cada haplotipo.

Figura 6. Distribución Mismatch para los grupos obtenidos por BAPS (Corander *et al.* 2003, 2004) y la muestra total de *Chirostoma humboldtianum* empleando el gen mitocondrial citocromo b. Las barras grises indican los valores observados y la línea negra muestra la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Figura 7. Distribución Mismatch para los grupos definidos por BAPS (Corander *et al.* 2003, 2004) y la muestra total de *Chirostoma humboldtianum* utilizando la región control mitocondrial. Las barras grises indican los valores observados y la línea negra muestra la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Figura 8. Gráficas bayesianas de línea al cielo para el citocromo b, el cual muestra el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 0.84% por millón de años para la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la

media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

Figura 9. Gráficas bayesianas de línea al cielo para el citocromo b, el cual muestra el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 1.52% por millón de años para la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

Figura 10. Gráficas bayesianas de línea al cielo para la región control el cual muestra el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 3.5% por millón de años para la especie *Chirostoma humboldtianum* de la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

Figura 11. Gráficas bayesianas de línea al cielo para la región control el cual muestra el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 12.5% por millón de años para la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

Figura 12. Árboles construidos por inferencia bayesiana usando BEAST (Drumond *et al.*, 2005) para las regiones mitocondriales citocromo b y región control. Se muestran los tiempos de divergencia estimados para. La cifra antes de la diagonal corresponde al tiempo de divergencia usando una tasa de 3.5% para la región control y de 0.84% para el citocromo b. La cifra después de la diagonal indica el tiempo de divergencia empleando la tasa de 12.5% para la región control y 1.52% para el citocromo b.

Figura 13. Resultados de STRUCTURE para la máxima probabilidad ~~para~~  $K$ , empleando el método de Evanno (Evanno *et al.* 2005), para un número de poblaciones  $K$  desde uno a seis, para ocho loci microsatelitales de la especie *Chiostoma humboldtianum* en la región central de México. Los picos  $\Delta$  en  $K$  se presentaron en  $K = 4$  y  $K = 6$ .

Figura 14. Análisis bayesiano de la estructura genética basada sobre ocho loci de microsátélites para la especie *Chiostoma humboldtianum* en la región central de México. Cada individuo es representado por una línea vertical, la cual es coloreada de acuerdo al grupo asignado para  $K = 6$ .

Figura 15. Gráficas del análisis de modo de cambio (mode shift) mostrando la distribución en forma de **L** de las frecuencias alélicas para ocho loci de microsátélites en las poblaciones de *C. humboldtianum* de la región central de México. Donde: T = Tiacaque, VV = Presa Villa Victoria, Z = Laguna de Zacapu, Tx = Presa Tepuxtepec, SJ = Laguna de San Juanico, SP = Laguna de San Pedro Lagunillas.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de las localidades muestreadas.

Tabla 2. Diversidad genética de secuencias del ADN mitocondrial (región control y citocromo b) para *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México.

Tabla 3. Resultados del análisis del agrupamiento bayesiano (BAPS) a partir de las secuencias del ADN mitocondrial (citocromo b y región control) para las localidades geográficas donde se muestreo *C. humboldtianum* en la región central de México (el número representa a los individuos de cada población que conforman el grupo).

Tabla 4. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) a partir de secuencias del ADN mitocondrial (citocromo b y región control) para las 6 localidades muestreadas en la región central de México para *C. humboldtianum*. Los valores de significancia asociados a los componentes de la varianza fueron obtenidos después de 10000 aleatorizaciones. (gl = grados de libertad).

Tabla 5. Valores de  $F_{ST}$  pareadas estimados para el citocromo b (debajo de la diagonal) y región control (arriba de la diagonal) para las localidades estudiadas de *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México.

Tabla 6. Parámetros demográficos estimados y prueba de neutralidad empleando las regiones mitocodriales citocromo b y región control para los grupos genéticos obtenidos a partir del análisis de BAPS (Corander *et al.* 2003; 2004) en la especie *Chirostoma humboldtianum* de la región central de México.

Tabla 7. Diversidad genética y alélica por locus para las localidades de Tiacaque (T), Presa Villa Victoria (VV), Presa Tepuxtepec (Tx), Laguna de Zacapu (Z), Laguna de San Juanico (SJ), Laguna de San Pedro Lagunillas (SP) de la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. Fis = índice de consanguinidad, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, H<sub>Nei</sub> = heterocigosidad esperada de Nei y A<sub>R</sub> = Riqueza alélica.

Tabla 8. Análisis de Varianza Molecular basado sobre  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  para las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum* de la región central de México, empleando ocho loci microsatelitales.

Tabla 9. Valores de  $F_{ST}$  pareadas (debajo de la diagonal) y de  $R_{ST}$  pareadas (arriba de la diagonal), para las poblaciones de *C. humboldtianum*.

Tabla 10. Pruebas para determinar cuellos de botella para las poblaciones de *C. humboldtianum* de la región central de México, empleando ocho loci de microsatélites.

## 1. RESUMEN

*Chirostoma humboldtianum* es una especie endémica distribuida ampliamente en cuencas aisladas en la región Central de México. Durante el Mioceno estas cuencas estuvieron conectadas, permitiendo la dispersión y colonización de nuevos sistemas hidrológicos. Posteriores eventos tectónicos, volcánicos y climáticos del Plio-Pleistoceno promovieron continuos periodos de aislamiento y reconexión, permitiendo que la especie evolucionara a través de continuos ciclos de expansión y contracción de sus poblaciones. Si estos factores fueron relevantes para moldear los patrones filogeográficos de la especie, entonces, la distribución geográfica y diversidad genética de las poblaciones existentes han de conservar las huellas de estos eventos. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue determinar las relaciones filogeográficas de las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinopsidae) de la región central de México a través del uso de marcadores microsatélite y ADN mitocondrial. En este estudio fueron usadas dos regiones mitocondriales, un fragmento de 1133pb del citocromo b y un segmento de 341pb del dominio I hipervariable de la región control; así como, ocho loci de microsatélites para analizar la diversidad genética y su distribución en seis lagos localizados en el centro de México.

Las estimaciones de diversidad haplotípica y nucleotídica para el citocromo b sugieren continuos periodos de expansión y contracción poblacional, sin embargo, la región control y los marcadores microsatelitales no mostraron la misma tendencia. Por otro lado, los análisis demográficos para los marcadores mitocondriales también sugieren periodos de expansión y contracción poblacional, los cuales coinciden

temporalmente con la formación de los lagos en el Pleistoceno. El análisis Bayesiano de estructura poblacional (BAPS) para los marcadores mitocondriales y para los genotipos multilocus (STRUCTURE) mostró diferentes conformaciones poblacionales para la especie, para el citocromo b, se encontraron cuatro grupos genéticos, para la región control cinco grupos y para los microsatélites seis grupos correspondientes con cada una de las localidades geográficas muestreadas. Las diferencias encontradas en los diferentes análisis para los tres marcadores moleculares pueden estar relacionadas con las tasas mutacionales del marcador molecular.

## 2. ABSTRACT

*Chirostoma humboldtianum* is an endemic species widely distributed in isolated basins in the region Central México. During the Miocene these basins were connected, allowing dispersal and colonization of new hydrological systems. Subsequent tectonic, volcanic and climatic events of the Plio-Pleistocene promoted continuous periods of isolation and reconnection, allowing the species to evolve through continuous cycles of expansion and contraction of this population. If these factors were important in shaping phylogeographic patterns of the species, then the geographical distribution and genetic diversity of the current population must preserve the traces of these events. Therefore, the aim of this study was to determine the phylogeographic relationships of the populations of *C. humboldtianum* (Pisces: Atherinopsidae) from central Mexico through the use of microsatellite markers and mitochondrial DNA. In this study were used two mitochondrial regions, a fragment of 1133pb from cytochrome b and a 341pb segment of the domain I of the hypervariable region of the mitochondrial control region, and eight microsatellite loci to analyze genetic diversity and their distribution in six lakes located in central México.

The values of haplotypic and nucleotide diversities for cytochrome b suggest continuous periods of population expansion and contraction, however, the control region and microsatellite markers do not show the same tendency. Moreover, demographic analyses for mitochondrial markers also suggest periods of expansion and contraction of populations, which are related with the formation of the lakes in the Pleistocene. Bayesian population structure (BAPS) analysis for mitochondrial markers



and multilocus genotypes (STRUCTURE) showed different structural population conformation for the specie, for cytochrome b, four genetics groups were detected, for the control region five groups and for the microsatellites loci six groups were found corresponding to each of the geographic location sample. The differences found in the different analyses for three molecular markers can be related with the mutational rates for each molecular marker.

## 3. INTRODUCCIÓN

La filogeografía es una disciplina que integra la dimensión del tiempo y el espacio para tratar de esclarecer los eventos que han dirigido a la distribución actual de la especie bajo diferentes escenarios evolutivos (Avice, 2004). El uso del polimorfismo del ADN, permite determinar procesos demográficos ocurridos durante diferentes periodos de expansión y contracción de las poblaciones ocurridas por los eventos históricos, a través del estudio de la estructura filogeográfica. Diversos trabajos realizados para la ictiofauna de la región central de México han asociado a los eventos geomorfológicos del Mioceno - Pleistoceno y paleoclimáticos como los eventos históricos que han influido en la dinámica evolutiva de las especies, y han señalado que estos eventos han creado un escenario hidrológico complejo, que han moldeado la distribución de muchas especies, así como, la estructura filogeográfica de la ictiofauna en esta región.

El atherinópsido endémico de la región central de México, *Chirostoma humboldtianum*, llega a ser un modelo ideal para realizar la reconstrucción de estos procesos históricos, debido a que presenta una distribución relictual (Barbour, 1973a; Miller *et al.*, 2005). Actualmente la especie se distribuye en cuerpos de agua aislados, sin embargo, depósitos lacustres fechados en el Mioceno sugieren que estos formaban parte de otros reservorios lacustres de extensiones mayores, que se conectaban a través del sistema Lerma - Santiago (Barbour, 1973a; Israde-Alcantara, 1997; Miller *et al.*, 2005), lo que permitió una distribución continua y que la especie se desplazara y colonizara nuevos sistemas hidrológicos en un sentido este - oeste, una vez que el ancestro penetró a aguas continentales a través de las costas del Atlántico. La formación de la Mesa Central durante el Plio - Pleistoceno acoplada con

procesos tectónicos llevó a la separación de los cuerpos de agua, la cual se intensificó por la formación del Eje Volcánico Transmexicano propiciando el aislamiento de las poblaciones de la especie (Echelle y Echelle, 1984). Esta actividad geológica en conjunto con los cambios climáticos del Plio-Pleistoceno promovieron continuos periodos de aislamiento y reconexión lo que generó un complejo sistema hidrológico (Israde-Alcantara, 1997; Moncayo-Estrada *et al.*, 2001) y posibles periodos de expansión y contracción poblacional de *C. humboldtianum*.

Si bien este escenario promueve una amplia complejidad para poder determinar cómo estos eventos históricos han moldeado la historia evolutiva de la especie, esto se ha hecho más complejo, debido al factor humano que ha propiciado, 1) disminución o extirpación de algunas de sus poblaciones en algunos cuerpos de agua debido a la contaminación, introducción de especies exóticas, reducción de los cuerpos de agua (Álvarez y Navarro, 1957; Barbour, 1973b; Paulo Maya *et al.* 2000) y una explotación exhaustiva y poco selectiva (Chacón y Rosas – Monge, 1995), 2) translocaciones de especies desde sus lugares de origen a otros donde ellas no se encontraban (Alaye, 1993; Barriga – Sosa, 2001) e 3) hibridación (Alaye, 1996) . Este efecto antropogénico, puede enmascarar los efectos de los eventos históricos que llevaron a la fragmentación natural de sus poblaciones, y procesos de expansión poblacional.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Estudios relacionados con la ictiofauna de la región central de México empleando herramientas filogeográficas han mostrado que su diversificación y su distribución geográfica están relacionadas con los procesos históricos ocurridos durante el Plio-Pleistoceno. Diversas hipótesis acerca del origen y los procesos históricos que han determinado la distribución geográfica del género *Chirostoma* han sido propuestas, sin embargo, hasta el momento no existen trabajos que permitan probarlas.

Debido a que las relaciones intraespecíficas y los procesos evolutivos que determinan la distribución de la variación genética de la especie *C. humboldtianum* no han sido estudiadas hasta el momento, en el presente trabajo se analizarán los factores potenciales que han determinado el patrón filogeográfico de la especie *C. humboldtianum* en la región central de México y analizar el efecto que tuvieron los eventos históricos sobre la estructura filogeográfica de la especie. Esta información puede ser relevante para la identificación de unidades de conservación y puede contribuir a desarrollar estrategias de conservación. Por lo cual, para realizar este estudio se emplearon dos fragmentos mitocondriales, el gen citocromo b, el cual ha sido utilizado en diversos trabajos filogeográficos para peces de agua dulce en México (Mateos *et al.*, 2002; Ornelas-García *et al.*, 2008; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2008) y un fragmento de la región control mitocondrial, que ha revelado ser de especial utilidad para análisis filogeográficos en una escala de tiempo más reciente (Ward *et al.*, 1993) debido a que muestra una rápida tasa de sustitución nucleotídica y altos niveles de polimorfismo intraespecífico (Avice, 2000; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Además se emplearon ocho loci tipo microsatélite específicos (García-

Martínez *et al.*, 2014) para inferir estructura y flujo genético reciente (Selkoe y Toonen, 2006).

## 5. MARCO TEÓRICO



México posee una amplia diversidad de peces de agua dulce (aprox. 500sp, Miller *et al.*, 2005) como una consecuencia de la combinación de características ecológicas e hidrológicas establecidas a partir de una compleja histórica geológica. La ictiofauna de la región Central de México comprende unas 78 especies en 26 géneros y nueve familias. Esta fauna fue formada a partir de grupos presentes en el Terciario temprano, con adiciones posteriores de especies del norte y algunas especies de peces de origen marino que tomaron residencia en la región central de México durante los periodos glaciares e interglaciares, de igual forma, se ha propuesto un origen marino para el género *Chirostoma*, uno de los taxones ícticos de mayor dominancia en la región central de México (Barbour y Chernoff, 1985; Miller y Smith, 1986).

## 5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El género *Chirostoma* empezó a ser considerado desde 1839 por Swason como un taxón válido, sin embargo, hasta la fecha el estatus taxonómico del grupo no ha sido resuelto. Uno de los trabajos taxonómicos quizá más importantes que amplio nuestro conocimiento acerca del grupo fue la monografía e historia evolutiva del género elaborada por Barbour (1973b), donde la clasificación taxonómica es discutida en términos de sus relaciones evolutivas y en el cual propone que *Chirostoma* es probablemente un grupo difilético. La propuesta anterior no fue apoyada por Echelle y Echelle (1984), quien a través de un análisis fenético y cladístico de datos electroforéticos, concluyeron que el género *Chirostoma* y *Poblana* comparten a *Menidia* como ancestro común y el cual no comparten con ningún otro

aterínido y los cuales deberían quedar incluidos bajo el nombre de *Menidia*. Miller *et al.* (2005) retomando estos antecedentes sinonimiza a los géneros *Chirostoma* y *Poblana* con *Menidia*.

El desarrollo de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y el uso de regiones del genoma permitieron la generación de nuevos trabajos basados en el uso de estas herramientas para tratar de resolver las relaciones taxonómicas de este grupo de peces. De esta forma Bloom *et al.* (2009) realizan un estudio filogenético con base en el gen mitocondrial ND2, con el cual, demuestra la monofilia de los atherinopsidos de la tribu Menidiini (*Menidia*, *Labidesthes*, *Poblana* y *Chirostoma*). Sin embargo, los resultados no soportan la monofilia de los géneros *Menidia* y *Chirostoma*. El clado de la Mesa Central de México fue recuperado como monofilético y fuertemente soportado. Dentro de este grupo el clado *humboldtianum* reconocido previamente (Echelle y Echelle 1984), es fuertemente soportado y la parafilia de *Chirostoma* con respecto a *Poblana*. El género *Menidia* (el cual incluye los géneros *Chirostoma*, *Poblana* y *Menidia*) como fue reconocido por Miller *et al.* (2005) no fue recuperado como monofilético.

Posteriormente Bloom *et al.* (2012) empleando tres exones del gen nuclear RAG1 y la región completa del citocromo b realizan una filogenia para siete de las ocho familias de Atheriniformes, dentro de las cuales se encuentra la familia Atherinopsidae a la cual pertenecen los géneros *Chirostoma*, *Poblana* y *Menidia*. A pesar de que el autor no particulariza sobre estos géneros, se observa claramente la monofilia fuertemente soportada entre *Chirostoma* y *Poblana*, sin embargo, al agruparla con *Menidia* la monofilia también es soportada. Así mismo, el trabajo de

Bloom *et al.* (2013) muestra resultados semejantes entre estos grupos empleando 2 genes mitocondriales y 2 nucleares. Lo anterior viene a soportar lo ya antes mencionado por Dyer (2007), quien realizó una revisión sistemática de los ateriniformes de América del sur, en el cual, si bien existe la evidencia de que *Menidia* y *Chirostoma* son grupos hermanos, que integran un solo clado, indica que la topología de la filogenia no es una razón suficiente para sinonimizarlos, debido a que al mantenerlos separados, ambos géneros siguen siendo grupos monofiléticos.

Por lo anterior y debido a que aún el estatus taxonómico del grupo no es totalmente claro, en el presente trabajo se tomará la clasificación propuesta por Barbour (1973b), puesto que la monofilia del grupo se conserva para los aterinopsidos de la Mesa Central incluyendo o no al género *Menidia*.

## 5.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

El género *Chirostoma* es endémico en la región central de México. Las 18 especies y seis subespecies propuestas por Barbour (1973b) se distribuyen a través del sistema Lerma-Santiago y cuencas contiguas; en los llanos de Puebla, Puebla-Tlaxcala; los llanos de Apan, Hidalgo; el valle de México, Distrito Federal-Estado de México; los Lagos del Valle del Tocuambo, Lagos de Zacápu, Zirahuen, Pátzcuaro y Cuitzeo, Michoacán; Laguna de Chapala, Lagos de Atotonilco, San Marcos y Juanacatlan, Jalisco y la Laguna de Santiaguillo, Durango. Dentro de este grupo de especies, *Chirostoma humboldtianum* es una de las que presenta la más amplia distribución. Esta especie lacustre se distribuía desde los lagos del Valle de México hasta los embalses ubicados en Santa María y San Pedro Lagunillas, en Nayarit

(Barbour 1973a, Miller 2005), sin embargo, actualmente su distribución se ha visto reducida.

La contaminación, alteración o destrucción de hábitats, pérdida del nivel de agua (Álvarez y Navarro, 1957; Barbour, 1973b; Paulo Maya *et al.* 2000) y la sobreexplotación pesquera (Chacón y Rosas – Monge, 1995), han puesto en riesgo de extinción a varias de las especies del género. En la actualidad estas crisis ecológicas han propiciado la pérdida de especies de algunas cuencas hidrológicas lo que ha generado el desabasto de este recurso y ha motivado la introducción de especies exóticas, que han dañado aun más las poblaciones nativas de estos peces.

En el caso particular de *C. humboldtianum* se ha documentado que la introducción de especies no nativas ha provocado la desaparición o reducción a un nivel extremadamente bajo de sus poblaciones en el oeste (Barbour 1973a), mientras que la contaminación, pérdida de hábitat y sobrepesca han jugado un rol importante en la declinación y extinción de las poblaciones locales de esta especie (Álvarez y Navarro 1957). Sin embargo, y a pesar de la información documentada desde hace casi seis décadas, la especie no ha sido ubicada dentro de las especies en peligro de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-Ecol-2010) ni en la lista roja IUCN.

### 5.3 ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL GÉNERO *CHIROSTOMA*

El origen de la ictiofauna mexicana puede ser explicada por la invasión de diversos grupos de Norteamérica, Centroamérica y representantes marinos que penetraron a las aguas continentales para establecerse y evolucionar dando origen a

una considerable cantidad de especies endémicas (Miller y Smith 1986), tal es el caso de los miembros de la familia Atherinopsidae. La diversificación de los atherinópsidos del género *Chirostoma* y de otros grupos de peces epicontinentales en la región central de México está fundamentalmente asociada con procesos vicariantes propiciados por actividad tecto-volcánica y fenómenos paleoclimáticos del Plio-Pleistoceno (Barbour, 1973a; Moncayo-Estrada *et al.*, 2001; Doadrio y Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2008), aunque algunos autores consideran que los fenómenos de segregación trófica también pudieron haber jugado un papel importante en la diversificación de estos grupos (Barbour, 1973b; Paulo-Maya, 2000), sin embargo, estudios recientes para especies que viven en simpatria han revelado que la diversidad de la dieta y los patrones de selectividad de presas fueron similares (García de León *et al.*, 2014).

Los periodos glaciares e interglaciares permitieron distintos episodios de colonización de especies de origen marino a aguas continentales (Miller, 1966, Miller y Chernoff 1979, Miller y Smith 1986) debido a las fluctuaciones en el nivel del mar que alteraron los márgenes costales, como es el caso de *Menidia* en la región central de la Florida (Arthur *et al.*, 1994). Por lo cual, se ha propuesto que un organismo semejante a *Menidia* penetró a territorio mexicano a través de las costas del Atlántico (Miller, 1966; Miller y Chernoff, 1979; Miller y Smith, 1986) durante el Pli-Pleistoceno. Episodios de mayor humedad permitieron que la especie ancestral se dirigiera hacia la región central de México colonizando diversos cuerpos de agua y que posteriormente los procesos tectónicos y volcánicos promovieran la diversificación y distribución geográfica del grupo a través de la cuenca de los ríos Lerma Santiago

(Miller, 1966; Álvarez, 1972; Barbour, 1973b Miller y Chernoff, 1979; Miller y Smith 1986; Miller *et al.* 2005). Las etapas de mayor humedad permitieron que la especie se expandiera y colonizara nuevas regiones mientras que los periodos de menor humedad propiciaron eventos de contracción de los cuerpos de agua. Se ha señalado que el Pleistoceno medio fue más húmedo que el Pleistoceno tardío, y que durante el Pleistoceno tardío, la región oeste del Eje Volcánico Transmexicano presentó mayor humedad que el este (Bradbury, 1997), así mismo, se ha señalado que finales del Pleistoceno fue un periodo muy seco que también permitió el incremento en la salinidad de los cuerpos de agua (Metcalf, 2006) y posiblemente la separación contundente de las poblaciones de nuestra especie de interés. Además, estos periodos de sequías y aumento de salinidad provocó en algún momento promover la contracción de las poblaciones y la posibilidad de cuellos de botella poblacionales. Por lo anterior una disciplina que nos permitiría estudiar esta historia tan compleja, sería la filogeografía.

#### 5.4 FILOGEOGRAFÍA

La estructura genética poblacional es el resultado de procesos contemporáneos e históricos (Hickerson *et al.*, 2010). Es por eso que las causas que permiten comprender los patrones históricos de la repartición genética espacio-temporal involucrados en los eventos de diversificación de los grupos taxonómicos (dispersión, vicarianza, selección, deriva, mutación, etc.) en el nivel intraespecífico pueden ser explorados por medio de herramientas filogeográficas (Templeton, 2006).

La filogeografía es definida por Avise (2000) como “el campo de estudio interesado en los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro y entre especies relativamente cercanas”. Esta disciplina engloba componentes históricos y filogenéticos de la distribución espacial de linajes genéticos, por lo que el tiempo y el espacio son los ejes principales de la filogeografía, en los cuales son mapeadas particularmente las genealogías de genes en estudio (Avise, 2000).

El trabajo de Avise y colaboradores en 1987, une los campos de la filogenética y genética de poblaciones, dos campos de estudio totalmente separados tanto en sus enfoques teóricos como metodológicos. La genética molecular toma un papel importante en la cohesión de estas dos disciplinas permitiendo realizar el análisis filogenético de datos genéticos contextualizados geográficamente y probar hipótesis con respecto a la relación causal entre los fenómenos geográficos, distribución de especies y los mecanismos que dirigen a la especiación (Avise, 2000; Avise *et al.*, 1987).

Tradicionalmente la teoría genética poblacional fue basada sobre métodos que permitían la estimación de los cambios de las frecuencia alélicas en futuras generaciones (Ewens, 2004). Sin embargo la teoría de la coalescencia formalizó una manera poderosa de utilizar solo las muestras de los alelos de tal manera que la genealogía de genes se modelen hacia atrás en el tiempo bajo prácticamente cualquier historia demográfica compleja con el fin de estimar parámetros filogeográficos tales como tamaño poblacional histórico, tiempos de divergencia y

tasas de migración dado el tiempo del evento coalescente (Hey y Machado, 2003; Wakeley, 2008).

## 5.5 TEORÍA DE LA COALESCENCIA

La teoría de la coalescencia es el marco metodológico y estadístico para probar hipótesis filogeográficas. Para que esta teoría se aplique correctamente, los genes o fragmentos de ADN elegidos deben ser neutros y bajo neutralidad. En una población de tamaño constante y a lo largo de las generaciones surgen nuevos alelos por mutación los cuales se pierden o fijan por deriva génica, de tal forma que todos los alelos de un gen en una generación derivan o coalescen hacia un único alelo ancestral (Kimura 1983). Tales mutaciones se acumulan con el tiempo de un modo aproximadamente uniforme (hipótesis del reloj molecular). La tasa promedio de mutación difiere según la especie y las regiones del genoma. Así, considerando un sitio particular en el genoma de la especie, todas las copias existentes de este sitio pueden estar relacionados unos con otros y a un ancestro común más reciente (ACMR) a través de alguna forma de árbol genealógico (Rosenberg y Nordborg 2002).

La idea fundamental de la coalescencia es que, en la ausencia de selección, los linajes muestreados pueden ser vistos como una selección aleatoria de sus padres a medida que regresamos en el tiempo, así dos linajes que son tomados de un mismo padre coalescen dentro de un solo linaje (Rosenberg y Nordborg 2002). La tasa a la cual los linajes coalescen depende del tamaño efectivo de la población, por lo que existe una fuerte relación entre la demografía y la filogenia de genes, debido a



que en las poblaciones naturales los factores demográficos determinan los tamaños poblacionales, y las variables demográfica son factores decisivos que gobiernan la profundidad, la forma y los patrones demográficos de los árboles de genes (Avice, 2000; Vázquez-Domínguez, 2009). De esta forma, la coalescencia junto con los análisis demográficos, pueden ayudar a determinar la existencia de periodos de expansión y reducción en una población permitiéndonos detectar los procesos históricos que han contribuido en la conformación de la estructura genética a través de la distribución geográfica de una especie.

## 5.6 TEORÍA NEUTRAL DE LA EVOLUCIÓN

Las inferencias realizadas a partir de los estudios del ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN nuclear (ADNn) parten del supuesto de que este sigue un modelo de evolución neutral. La teoría neutral establece que la mayoría de los cambios evolutivos en el nivel molecular no son causados por la selección Darwiniana si no por la fijación al azar de mutantes selectivamente neutros de la especie (Nei, 2013). La teoría también establece que mucha de la variabilidad genética intraespecífica en el nivel molecular es esencialmente neutral, de modo que los alelos polimórficos son mantenidos en la especie por el balance entre mutación y deriva génica, en cada generación aparece cierto número de mutantes neutros que con el tiempo, o se fijan en la población o se pierden, durante ese proceso contribuyen a la variabilidad genética a través del polimorfismo (Kimura, 1983).

## 5.7 EL ADN MITOCONDRIAL

El ADNmt es una molécula que puede analizarse mediante diferentes herramientas de biología molecular y ha sido muy útil en la reconstrucción del pasado reciente debido a que presenta una alta tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos, su herencia es estrictamente materna con una prácticamente nula recombinación y presenta una gran variación intraespecífica (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009; Hickerson *et al.*, 2010). Sin embargo, el ADNmt presenta diferentes retos al ser utilizado como una herramienta filogeográfica: su potencial de neutralidad (Williams *et al.*, 1995), es decir, la posibilidad de haber estado sujeto a selección (Rand, 1994; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009), la incorporación del ADNmt dentro del genoma nuclear (Zhang y Hewitt, 1996) y la posibilidad de que el ADNmt haya pasado recientemente de una especie a otra por hibridización (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Además es altamente sensible a cuellos de botella y la posibilidad de que esta herencia materna resulte en una reconstrucción incompleta de la historia poblacional si hembras y machos tiene patrones de dispersión diferentes (Avice, 2000; Freeland, 2005).

### 5.7.1 Citocromo *b*

El citocromo *b* ha sido utilizado para una diversidad de cuestiones sistemáticas desde un filogenia profunda (Meyer y Wilson, 1990; Irwin *et al.*, 1991; Doadrio y Domínguez, 2004; Bloom *et al.*, 2013) hasta los niveles poblacionales y de divergencia reciente (Lovejoy y de Araújo, 2000; Near *et al.*, 2001; Mateos *et al.*, 2002; Ornelas-García *et al.*, 2008).

Sin embargo muchos problemas han sido encontrados al usar este gen, entre ellos se pueden mencionar sesgos en la composición de las bases, tasa de variación entre linajes, saturación en la tercera posición del codón y variación limitada en la primera y segunda posición del codón, resultando poco informativos para cuestiones evolutivas profundas o con pocos sitios informativos para la tercera posición del codón en el nivel poblacional (Meyer, 1994).

### 5.7.2 *Región Control*

La región control es un componente de la molécula de ADNmt no codificante que controla la replicación y transcripción. Está constituida por 1122 pares de bases ubicada entre el gen que codifica para el ARN de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina. Esta región destaca por su elevada tasa de sustitución nucleotídica (aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes) y alto nivel de polimorfismo intraespecífico (Brown, 1985; Vigilant *et al.*, 1991; Lunt *et al.*, 1998). En los vertebrados la región control está comúnmente dividida dentro de tres dominios (Figura 1) que difieren en cuanto a su composición de bases como en su tasa y modo de evolución (Lee *et al.*, 1995; Saunders y Edwards, 2000). El dominio central contiene el origen de la cadena pesada de replicación, es relativamente conservada y se caracteriza por un alto contenido de GC. En contraste, los dos dominios que flanquean la región central (dominio I y II) son típicamente hipervariables en sustitución de bases y en diferente composición de bases (Saccone *et al.*, 1987). Debido a la rápida tasa de evolución del dominio I y II la región control ha sido

generalmente considerada como la más apropiada para estudios intraespecíficos (Avise, 2000; Saunders y Edwards, 2000).

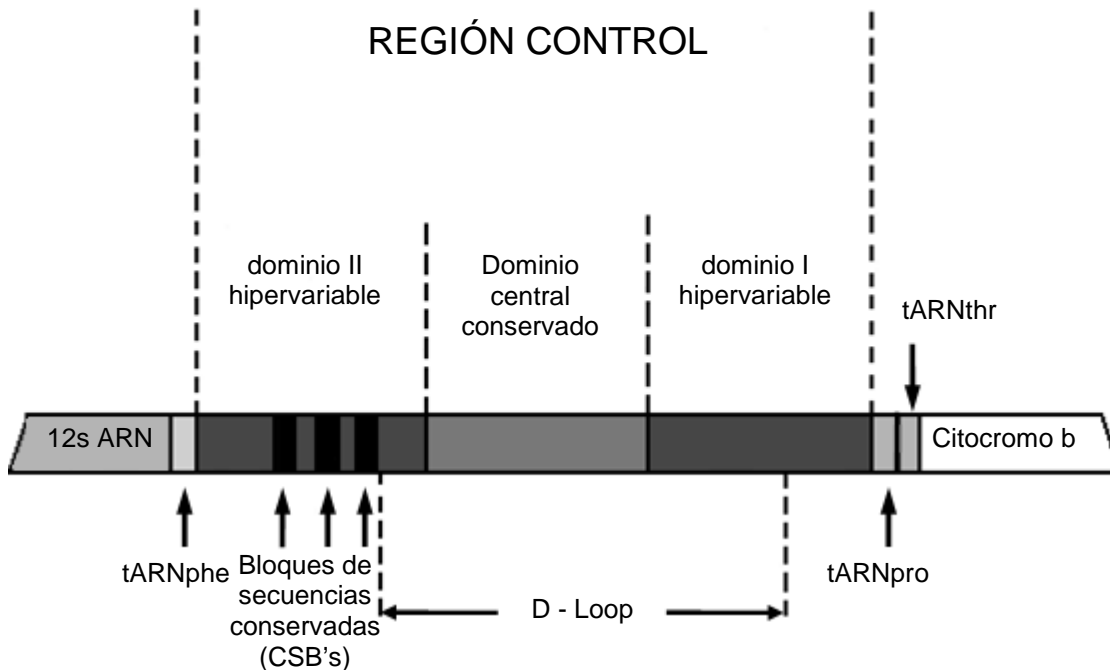


Figura 1. Diagrama esquemático de los tres dominios de la región control del ADN mitocondrial (tomado de Avise 2000).

### 5.8 MICROSATELITES.

Los microsatélites son marcadores codominantes que presentan una herencia mendeliana que consisten en secuencias cortas (de 1 a 6 bases nucleotídicas) repetidas en tándem un alto número de veces, generalmente menores a 5bp en longitud (Hancock, 1999), flanqueadas por secuencias conservadas, las cuales confieren especificidad en cada locus microsatélital. Son muy abundantes en el genoma nuclear de todos los eucariotes, algunos procariones, en los genomas de los

cloroplastos de las plantas (McCauley, 1995; Provan *et al.*, 2001), e incluso hay evidencia de su presencia en algunos genomas mitocondriales de vertebrados (Hoelzel *et al.*, 1993). Los microsatélites pueden encontrarse en regiones no codificantes como regiones heterocromáticas del genoma, centroméricas y teloméricas de cromosomas autosómicos, sexuales y codificantes de proteínas (Hoy, 2003). Son altamente polimórficos y se ha estimado que su tasa de mutación varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  por locus por generación y un promedio de  $5 \times 10^{-4}$  (Schlötterer, 2000; Chakraborty *et al.*, 1997) haciéndolos útiles para estudiar evolución en tiempos cortos, cientos o miles de años (Hancock, 1999). El mecanismo que explica este alto grado de polimorfismo es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Schlötterer, 1994).

Los microsatélites se definen por el tipo de unidades de repetición (UR) y por su longitud o número de repeticiones en una posición concreta en el cromosoma (locus), con base en esto se clasifican en tres grupos: 1) Perfectos, repeticiones en un número mínimo de 9 UR sin interrupción y sin repeticiones adyacentes, 2) Compuestos, con dos o más repeticiones de al menos 9 UR ininterrumpidas, las cuales pueden ser combinaciones de motivos de un número variable de pares de bases, 3) Interrumpidos, repeticiones ininterrumpidas de al menos 9 UR separadas como máximo por 4 pares de bases.

Los mecanismos de evolución de los microsatélites aún no son claros y existe controversia sobre que patrones siguen en los cambios de tamaño de alelos de una generación a otra y que factores determinan la tasa de mutación (Hancock, 1999). Existen tres modelos que se han considerado para explicar su evolución: el modelo

de alelos infinitos (IAM, Kimura y Crow, 1964), el modelo del K-alelo (KAM, Crow y Kimura, 1970) y el modelo de salto mutacional (SMM, Kimura y Otha, 1978).

Debido a que la identificación de los alelos está basado en su tamaño esto requiere el supuesto de que todos los distintos alelos para un mismo locus difieren en longitud, por lo tanto los alelos del mismo tamaño según esta hipótesis tendrían la misma secuencia nucleotídica, en el caso de que no, entonces serán diferentes linajes, a esto se le conoce como “homoplasia”, y representa una limitación en el uso de este tipo de marcadores.

Li *et al.* (2002) detallan un conjunto de presuntos roles funcionales del ADN microsatelital, tales como la organización de la cromatina, y regulación de la actividad de genes, recombinación, replicación del ADN y sistemas de reparación del ADN, demostrando que los microsatélites por si mismos pueden estar bajo selección directa. Además, diversas enfermedades humanas heredables, tal como la enfermedad de Huntington son directamente causadas por mutación en loci de microsatélites (Ranum y Day, 2002). Alternativamente un microsatelite puede situarse adyacente a un gen bajo selección y aparentar ser no neutral debido al acarreo genético “hitchhiking”. Lo anterior muestra que la neutralidad de los marcadores microsatelitales no debe ser tomada como una garantía y esta debe ser probada por cada locus evaluado, no obstante probar que estén bajo selección no es una tarea trivial.

## 6. ANTECEDENTES

Hasta el momento no existen trabajos que permitan determinar los factores históricos que han determinado la distribución geográfica de las poblaciones de *Chiostoma humboldtianum*. Barbour (1973b) propone que los cambios geomorfológicos del Mioceno – Pleistoceno y los periodos glaciares e inter - glaciares del Plio - Pleistoceno ocurridos en la región central de México promovieron la diversificación del grupo en un sentido este-oeste; y la distribución de las especies. Diversos autores (Miller, 1966; Miller y Chernoff, 1979; Miller y Smith, 1986) han propuesto que el ancestro de *Chiostoma* penetró a aguas continentales a través de la costa del Atlántico, por el río Bravo y tomó residencia en la región central de México. Estudios recientes han propuesto una conexión Plio-Pleistocénica entre las costas del Atlántico y la Mesa Central Mexicana (Bloom *et al.* 2009, Bloom *et al.* 2013). Por otro lado, Echelle y Echelle (1984) sugieren que el género divergió de una ancestro compartido con *Menidia* hace 10.8 a 20.1 Ma.

De acuerdo a Álvarez (1972) la existencia de una gran lago en el Valle de México le permitió al ancestro desplazarse y tomar residencia en esta zona. Sin embargo, la idea de un gran lago ancestral no fue soportada por los trabajos de Israde – Alcantara (1997) e Israde-Alcantara y Garduño-Monroy (1999) los cuales describen la bioestratigrafía lacustre del Lago del Cuitzeo y su evolución, dentro del sector central del Eje Volcánico Trans-Mexicano. Estos trabajos sugieren la presencia de una serie de paleolagos de origen tectónico en el Neógeno los cuales fueron evolucionando como resultado de los eventos tectónico – volcánicos del Eje Volcánico Trans-Mexicano durante el Mioceno tardío al Cuaternario.



El análisis filogeográfico de algunos grupos de peces, como los ciprinidos, poecilidos, godeidos, así como algunos parásitos de estos últimos, han permitido establecer hipótesis que sugieren antiguas conexiones entre estos paleolagos y soportar la idea de que la alta actividad tectónica y volcánica a lo largo del Eje Volcánico Trans-Mexicano, así como los cambios climáticos han sido las causas más probables para el aislamiento en estos cuerpos de agua. Así mismo, estos factores han sido relacionados con los procesos de diversificación de la ictiofauna de la región central de México durante el Mioceno Tardío al Plioceno, y han sido un factor importante sobre la diversificación y la distribución geográfica de las especies.

Por lo anterior, dentro de estos antecedentes se mencionaran trabajos tanto filogeográficos como filogenéticos que abordan los anteriores aspectos para la ictiofauna de la Mesa Central de México y cuyas regiones de estudio se encuentran relacionadas con la distribución geográfica de nuestra especie. Los antecedentes se presentaran de una manera cronológica en primera instancia para los ciprinidos, poecilidos, godeidos y finalmente para parásitos relacionados a estos últimos.

Schönhuth y Doadrio (2003) analizan las relaciones filogenéticas del género *Notropis* (Actinopterygii, Cyprinidae) empleando la secuencia completa del gen mitocondrial citocromo b, para individuos del sur y centro de México, en esta última región, las especies se encuentran distribuidas sobre el Eje Volcánico Transmexicano, habitando drenajes del Río Lerma, Lagos de la Mesa Central y la cabecera del Río Panuco. Sus resultados muestran una relación más cercana entre aquellas especies distribuidas en las cuencas del Lerma y el Cuitzeo y las más

divergentes entre especies distribuidas en la laguna de Zacapu y la cuenca del Balsas.

El trabajo de Mateos *et al.* (2002) en el cual analizan la historia biogeográfica del género *Poeciliopsis* empleando los genes mitocondriales citocromo b y NADH subunidad 2, dentro de este grupo *Poeciliopsis infans* es la única especie que se distribuye completamente en una región definida por el Eje volcánico Transmexicano, en lo que fue la región del Paleolago de Jalisco. Uno de los clados está constituido por haplotipos del Río Ameca, Río Verde (drenajes del bajo Santiago) y el lago de Atotonilco; el segundo clado conformado por el Río Lerma, Lago de Chapala, drenajes del alto Santiago y Río Panuco. La separación entre el alto y bajo Santiago se ha señalado durante el Pleistoceno (2 -4 ma) debido al vulcanismo, que también provocó el aislamiento de otros cuerpos de agua en el Paleolago de Jalisco. Así mismo, se señaló una conexión reciente entre el Río Santiago y Río Ameca y una posterior separación debida al vulcanismo de la fosa tectónica o graben Tepic – Zacoalco durante el Pleistoceno.

Moncayo – Estrada *et al.* (2001) analiza los aspectos históricos que determinaron el origen y distribución de godeido *Hubbsina turneri* por medio de un análisis de biogeografía histórica. En este trabajo se sugiere que tanto *Hubbsina* y *Girardinichthis* pudieron expandirse y distribuirse en el alto y medio Lerma durante el Mioceno medio – superior (10 – 7 Ma.), cuando hubo periodos de mayor humedad permitiendo el desarrollo de drenes fluviales, así como su continuidad y permanencia de zonas inundadas. En el Mioceno superior – Plioceno (7 – 3.5 Ma.) se da el aislamiento entre el alto y medio Lerma por la falla Taxco – Querétaro y la separación

de los géneros antes mencionados. Así mismo, sugieren la presencia de extensos sistemas lacustres aislados en las regiones de Chapala con dirección a Atlacomulco, entre 6 – 4 Ma, permitiendo la diversificación de los godeidos. El aislamiento se intensifica en el Plioceno medio – superior asociado posiblemente con los ciclos glaciares e interglaciares. Por otro lado, se sugiere que el Valle de México formó parte del Alto Lerma en el Mioceno Medio, separándose en el Mioceno superior, sin embargo se sugiere una reconexión sucesiva a finales del Pleistoceno a través de la falla NE-SW y E- W que corta la Sierra de las Cruces. En cuanto a región de Zacapu, se ha señalado que Cuitzeo formó parte del Lerma y el cual se unía a Zirahuen, Pátzcuaro y Zacapu, formando un protolago, la separación definitiva entre Zacapu y Cuitzeo es señalado a finales del Pleistoceno y principios del Holoceno (menos de 1 Ma.) debido a los eventos volcánicos en el corredor Chucándiro – Huaniqueo.

Webb *et al.* (2004) establecen las relaciones filogenéticas para 36 especies de peces pertenecientes a la familia Goodeidae a través del uso de un fragmento de 627pb del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) y 430 pb para la región control, la calibración de sus datos por medio del registro fósil sugieren una edad aproximada de la familia de 16.5 Ma (Mioceno). Los autores sugieren que los picos de actividad geológica en la Mesa Central durante el Mioceno medio están correlacionados con la diversificación de los godeidos, y que las elevaciones orogénicas actuales (10 o 5 Ma) están relacionadas con la distribución de peces. La conexión entre el Río Ameca y el Río Lerma – Grande de Santiago es sugerida con base en la distribución de algunas especies de godeidos y sus datos sugieren diversos eventos de conexión durante el Mioceno tardío y el Pleistoceno tardío.

Doadrio y Domínguez (2004) quienes realizando un análisis filogenético de la familia Goodeidae en la región central de México, con base en el gen mitocondrial citocromo b, indican que esta familia originada durante el Mioceno medio obtuvo su más alta diversificación durante el periodo de secas del Plioceno, debido a la separación de cuencas en la Mesa Central de México. La elevación de la Mesa Central y el inicio de la actividad volcánica en la región oeste del Eje volcánico Transmexicano durante el Mioceno superior permitieron la separación de algunos grupos de godeidos (*Ilyodon*), sin embargo, subsecuentes conexiones permitieron un nuevo periodo de dispersión entre algunos cuerpos de agua en esta zona occidental; evento que terminó durante el Plioceno. Otro evento relevante para nuestro trabajo es aquel en el cual los autores indican que la cuenca del Balsas comparte algunas pocas especies de godeidos con lagos y ríos de la Mesa Central y lo cual les permite sugerir que esto puede ser resultado de un fenómeno de erosión relativamente reciente que permitió que el sistema Lerma vaciara sus aguas y sus peces hacia la cuenca del Balsas. Para la región del alto Lerma y el bajo Lerma fueron estudiados a través del clado Girardichthyini indican una separación de hace 7 millones de años por medio de la falla Taxco – Querétaro. Mientras que el Valle de México fue separado del alto Lerma por la falla Chapala – Tula durante el Mioceno superior. La separación entre el lago de Cuitzeo y Zacapu ha sido señalado por los autores durante el Plioceno superior (2 Ma.)

Domínguez – Domínguez *et al.* (2008) quienes a través del estudio de la historia evolutiva de *Zoogoneticus quitzeoensis* basado sobre datos mitocondriales y nucleares señalan conexiones recientes, entre cuerpos de agua como consecuencia

de eventos de mayor precipitación y humedad durante el Plioceno temprano (5.2 – 3.6 ma) entre el bajo Lerma – Chapala y el Medio Lerma- Cuitzeo – Zacapu, con una posterior fragmentación alopátrica, relacionada con el fin de periodos de humedad y/o la formación de barreras biogeográficas como la falla Tula – Chapala y la formación volcánica del corredor Tarasco (Mioceno Tardío – Plioceno temprano). Sin embargo, los análisis de expansión mostraron eventos de dispersión en el inicio del Pleistoceno (1.4 ma.) desde la región del Paleolago Chapala hacia el Río Ameca vía el Paleolago Zacoalco – Ameca y entre Zacapu y Cuitzeo hace 0.54 ma., pero, los tiempos de divergencia para esta última zona sugieren más que un evento de conexión ocurrido en los últimos tres millones de años.

Mejía – Madrid *et al.* (2007) analizan la filogeografía del nematodo parasito *Rhabdocona lichtenfelsi* (Nematoda) específico a godeidos endémicos de agua dulce de la Mesa Central. Sus resultados muestran que la distribución de los haplotipos y la diversidad genética y divergencia reflejan la distribución de las cuencas y cuerpos de agua de la Mesa Central durante un periodo geológico reciente (Pleistoceno). Debido a que algunos cuerpos de agua, como es el caso de Zacapu, no se agrupan de acuerdo a la moderna fisiografía de la región de la Mesa Central, los autores concluyen que la distribución de los haplotipos del oeste de *R. lichtenfelsi* no reflejan la distribución moderna de las cuencas de la Mesa Central en esta región.

Si bien, los eventos históricos durante el Mioceno al Pleistoceno han tenido un fuerte impacto sobre la ictiofauna de la región central de México, llega a ser muy complejo identificar los procesos que han moldeado la distribución de las especies sobre todo para un área de fuerte actividad tecto – volcánica o paleoclimática o cuyo

aislamiento es relativamente reciente (Domínguez – Domínguez, 2009). Es interesante señalar que ninguno de los estudios anteriores mencionan como factor relevante las muy amplias actividades humanas sobre las relaciones filogenéticas observadas. Sin embargo, algunos trabajos realizados para especies del género *Chirostoma* (*C. humboldtianum*, incluida) relacionados con la diversidad genética y estructura genética intraespecífica (Barriga-Sosa *et al.*, 2002, 2004 y 2007), han mostrado la presencia de *Chirostoma* en algunos cuerpos de agua que no representaban parte de su distribución originar y han sugerido procesos de hibridación entre esta y otras especies del género, principalmente de peces blancos (Barriga – Sosa *et al.*, 2002), lo cual deber ser considerado en la interpretación de nuestros resultados.

## 7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Dado que la filogeografía es una disciplina que permite determinar cómo los procesos históricos han moldeado la historia evolutiva de las especies, cabe preguntar si ¿los eventos geomorfológicos y climáticos ocurridos en la región central de México durante el Plio – Pleistoceno, han moldeado la estructura filogeográfica de las poblaciones de *Chirotoma humboldtianum*?



## 8. HIPÓTESIS

## Hipótesis

Si la separación entre las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum* a lo largo de su distribución geográfica fue consecuencia de los eventos geomorfológicos y climáticos del Plio-Pleistoceno, entonces se esperaría:

1. Niveles altos de variación genética exclusiva de cada población y alto grado de diferenciación genética entre ellas, asociado a la separación histórica de las poblaciones.
2. Periodos de expansión poblacional posteriores a la separación de las poblaciones y una correlación entre la historia genética de las poblaciones y los eventos históricos del Plio – Pleistoceno.

## 9. OBJETIVOS

## 9.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores potenciales que han influido en la historia filogeográfica de la especie *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinopsidae) a través del uso de marcadores mitocondriales y microsatélites.

## 9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la estructura genética de las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum*
- Inferir las relaciones genealogicas de la especie *Chirostoma humboldtianum* para determinar eventos de diversificación y demografía histórica.

# 10. MATERIALES Y MÉTODOS

## 10.1 RECOLECTA E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Se recolectaron 48 individuos en cada una de las seis localidades geográficas ubicadas en el Estado de México, Michoacán, Jalisco y Nayarit para la especie *Chirosotoma humboldtianum* (Tabla 1 y Figura 2). Los organismos se capturaron empleando chinchorros de 3m de longitud de malla fina. Los peces de cada una de las localidades se conservaron en alcohol al 95%, para su transporte al laboratorio y posterior estudio. Los organismos fueron transportados al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa para la determinación o confirmación taxonómica empleando las claves taxonómicas de Miller *et al.* 2005.

Tabla 1. Relación de las localidades muestreadas.

Localidad	Estado	Clave	n	Altitud (msnm)	Coordenadas geográfica	Año de colecta
Presa Las Tazas (Tiacaque)	Edo. de México	T	48	2540	19°38'29"N-99°42'27"O	2002
Presa Villa Victoria	Edo. de México	VV	48	2570	19°26'N-100°00'O	2009
Presa Tepuxtepec	Michoacán	Tx	48	2361	19°59'42"N-100°13'33"O	2010
Laguna de Zacapu	Michoacán	Z	48	1980	19°49'26"N-101°46'45"	2003
Laguna de San Juanico	Michoacán	SJ	48	1625	19°51'16"N-102°40'34"O	2010
Laguna de San Pedro Lagunillas	Nayarit	SP	48	1248	21°12'48"N-104°44'12"O	2010

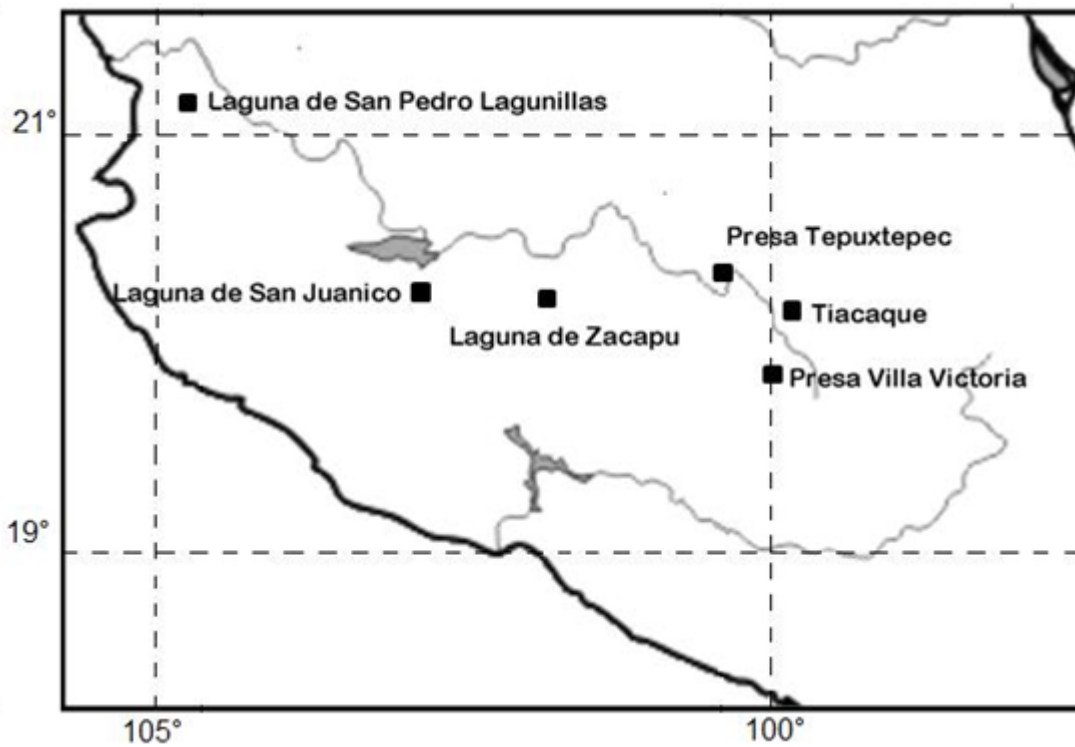


Figura 2. Mapa que muestra las localidades de recolecta de *Chirostoma humboldtianum*.

## 10.2 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de músculo usando el protocolo de Aljanabi y Martínez (1997), para individuos colectados de *Chirostoma humboldtianum* y los grupos externos empleados en este estudio, *Poblana letholepis* y *Chirostoma jordani*. Los productos de extracción se cuantificaron (ng/μl) en un espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer y se determinó la calidad de la muestra a partir de un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.0%, por medio de la comparación con un marcador de peso molecular conocido, para el cual se utilizó el ADN del fago Lambda cortado con *HindIII*, el cual contiene 8 fragmentos discretos en

un rango de 125pb a 23,130pb. El ADN total se visualizó en un fotodocumentador Multi Genius de Syngene, el cual permite la visualización de los productos de ADN una vez teñidos con bromuro de etidio, esta sustancia fluorescente se intercala en la molécula y a través de la exposición con luz ultravioleta se observa el resultado del corrimiento electroforético. La imagen fue capturada con la ayuda del programa GENE SNAP Versión 6.02.05.

### 10.3 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES MITOCONDRIALES

Para determinar la estructura filogeográfica de *Chirostoma humboldtianum*, fueron empleados el gen completo del citocromo B y un fragmento de 360 pares de bases de la región hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.

Para el citocromo b se utilizaron los iniciadores descritos por Palumbi *et al.* (1991): B-gludg-L14720 y B2-H15149 para amplificar el gen que consiste de aproximadamente 1350bp y bajo las condiciones de reacción descritas por los mismos autores. Para la región control se utilizaron los iniciadores descritos por Pérez-Ramírez (2003), DloopF (“Forward”) 5'-CTA ACT CCC AAA GCT AGG ATT-3' (57% A-T, 43% G-C) Tm= 58°C y DloopR1 (“Reverse”) 5'-AAC CCC CAC GAT TGC TGT CC-3' (40% A-T, 60% G-C) Tm= 70°C, específicos para este género. La reacción de PCR para ambos fragmentos mitocondriales se realizó en un volumen final de 25µl y usando un Biorad MyCycler Thermal Cycler (USA). La reacción de PCR contenía 50-100ng de ADN, regulador de PCR al 1X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM de la mezcla de dNTPs, 10pM de cada iniciador “forward” y “reverse” y 1U de enzima Promega GoTaq PCR. El programa de PCR usado para el citocromo b incluye 1 ciclo



de desnaturalización de 1.5 min a 94°C, seguido por 2 min de alineamiento a 52.1°C y un periodo de extensión por 1 min a 72°C; seguido por 30 ciclos de un paso de desnaturalización de 1.5 min a 94°C, un alineamiento de 2 min a 52.1°C y un periodo de extensión de 72°C por 1 min, por último, una extensión final a 72°C por 5 min y finalmente se mantuvo en un periodo indefinido de refrigeración a 4°C. Para la Región control el programa de PCR que se utilizó incluye un paso de desnaturalización inicial de 96°C por 2 min, seguida por 30 ciclos de 96°C por 45 seg, 59.2 °C por 30 seg, y 72°C por 45 seg, con una extensión final de 72°C por 5 min.

Para ambas regiones mitocondriales los productos de amplificación de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% y visualizados por tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador Multi Genius a partir de la exposición con luz ultravioleta. Los productos amplificados fueron purificados usando el paquete comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en ambas direcciones usando los iniciadores de la PCR “forward” y “reverse” en una reacción de 10µl que contenía 2µl del paquete comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), 2µl de regulador al 2X, 1µl de cada iniciador (10pm), 3µl del ADN molde (que contenía aproximadamente 50 ng de ADN) y 2µl de agua bidestilada. Las condiciones empleadas en la reacción de secuenciación para el citocromo b fueron: 35 ciclos a 96°C por 30s, 52.1°C por 15s y 60°C por 4min. Mientras que para la región control las condiciones de amplificación fueron: 35 ciclos a 96°C por 30s, 59.2°C por 15s y 60°C por 4min. Las reacciones de secuenciación fueron resueltas

en el secuenciador automático ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems) en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa.

#### 10.4 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITE.

El ADN genómico extraído a partir del protocolo de sales se usó como molde para la reacción de PCR. Ocho loci microsatelitales (García – Martínez *et al.*, 2014) fueron amplificados por PCR para 48 individuos de cada localidad geográfica en un volumen final de 15  $\mu$ l, la reacción contenía 100 ng/ $\mu$ l de ADN, 10 pmol de cada iniciador, 0.5 U *Taq* de ADN polimerasa (Promega), 200  $\mu$ M de cada dNTP, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y regulador de PCR al 1X (15mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La reacción de PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD thermocycler de la siguiente forma: 95°C por 5 min o 10 min, seguido por 30 ciclos de 15 sec a 94°C, 45 sec a una temperatura que vario entre 50°C y 60°C dependiendo del locus y 15sec a 72°C, con una extensión final de 5 min a 70°C. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI Prism 3100 Avantat en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) de la UAM-Iztapalapa. El tamaño de los alelos fue determinado usando LIZ-500 como marcador de tamaño estándar (Applied Biosystems) y el programa GENEMARKER Versión 2.4.0 donde se realizaron las lecturas de los alelos.

## 10.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL ADN MITOCONDRIAL.

### 10.5.1 *Edición y alineamiento de secuencias.*

Las secuencias de ADN compiladas para cada región mitocondrial fueron editadas en BIOEDIT (Hall, 1999) cotejando los electroferogramas “*forward*” y “*reverse*” correspondientes a cada muestra. La alineación de las secuencias se realizó para cada región por separado con Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) con los parámetros “*default*”. Las secuencias del Citocromo b al ser codificantes de proteínas carecen de “*indels*” por lo que se alinearon sin ambigüedad. Las secuencias fueron traducidas a amino ácidos utilizando el código genético mitocondrial de vertebrados, para verificar las lecturas y revisar si existían codones de paro que indiquen la presencia de pseudogenes.

### 10.5.2 *Diversidad genética.*

Las secuencias alineadas y editadas fueron usadas en todos los análisis subsecuentes. La diversidad genética para cada localidad geográfica fue establecida por el número de haplotipos, número de sitios polimórficos, diversidad haplotípica ( $h$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), estos parámetros fueron calculados usando el programa DNASP Versión 5 (Librado y Rozas, 2009) para cada región mitocondrial por separado.

### 10.5.3 *Análisis genealógico.*

La relación entre haplotipos se analizó por medio de inferencia bayesiana utilizando como grupo externo las secuencias de *Poblana letholepis* y *Chirostoma*

*jordani* obtenidas en este trabajo. Los modelos de sustitución más apropiados se seleccionaron con la ayuda del programa jMODELTEST Versión 3.07 (Posadas y Crandall, 1998) utilizando el método de Criterio de Información Bayesiana (BIC) para cada región y para el conjunto de datos. Para el citocromo b el mejor modelo encontrado fue TIM2 + I + G. La proporción de sitios invariables (I) se estimó en 0.6950 y el parámetro de forma de la distribución gama en 0.7210. El modelo más adecuado para los datos de la región control fue HKY + I + G con una proporción de sitios invariables (I) estimada en 0.4550 y un parámetro de forma de la distribución gamma de 0.3910. Posteriormente se realizó un tercer análisis, en el cual se concatenaron las dos secuencias para un mismo individuo, si no se presentaba alguna de las secuencias estas eran descartadas. El modelo de sustitución para este tercer análisis fue TRN + I + G. La proporción de sitios invariables (I) se calculó en 0.650 y el parámetro de forma de la distribución gamma en 0.484.

Para determinar la relación existente entre los haplotipos pertenecientes a cada una de las localidades geográficas se llevó a cabo un análisis genealógico por medio de una inferencia Bayesiano empleando los datos mitocondriales concatenados, este análisis se implementó en el programa MrBAYES Versión 3.0 b4 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se realizaron dos corridas independientes cada una con 2 millones de generaciones muestreadas en intervalos de 1000 generaciones. Para ambas corridas se implementaron cuatro cadenas de Markov comenzando con un árbol al azar. Una vez que los distintos análisis alcanzaron la misma estacionalidad en verosimilitudes similares y que las topologías fueron congruentes, los árboles resultantes se combinaron por medio de un árbol de consenso de

mayoría en PAUP Versión 4 (Swofford, 1998), indicando las probabilidades posteriores mayores a 50% para cada rama. Así mismo, se consideraron significativamente apoyados los cladogramas con probabilidades posteriores (PP)  $\geq 95\%$ .

En adición, las relaciones genealógicas fueron examinadas por medio de una red de haplotipos usando el algoritmo median-joining implementado en el programa NETWORK Versión 4.6.1.2 (Bandelt *et al.*, 1999) para visualizar los pasos mutacionales y diferencias en la composición de haplotipos.

#### 10.5.4 Estructura poblacional y diferenciación poblacional.

La estructura poblacional fue determinada usando un método Bayesiano implementado en el programa BAPS (Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional, por sus siglas en inglés) (Corander *et al.*, 2003; 2004), el cual asume que una especie podría estar genéticamente estructurada debido a un aislamiento genético que generó una divergencia entre las poblaciones (Corander *et al.*, 2008). BAPS fue corrido bajo un modelo espacial con el máximo número de grupos ( $K$ ) desde 1 a 20 como sugiere el programa. Cada corrida fue replicada seis veces y los resultados se promediaron para obtener el valor de máxima probabilidad resultante.

La distribución espacial de la variación genética fue explorada a través de un análisis jerárquico de diferenciación poblacional a partir del cálculo de los valores  $F_{ST}$  determinados por medio de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés; Excoffier *et al.*, 1992) con niveles de significancia de  $\alpha = 0.05$  y 10,000 permutaciones aleatorias implementadas en el programa ARLEQUIN Versión 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). La variación genética total fue particionada de

acuerdo al número de grupos definidos en el programa BAPS. El nivel de diferenciación genética entre localidades geográficas fue evaluado *a posteriori* por medio de las  $F_{ST}$  pareadas (Excoffier *et al.*, 1992). Los valores de significancia de las  $F_{ST}$  fueron evaluados después de 10,000 replicas con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Los índices de diversidad genética y valores  $F_{ST}$  fueron calculados usando el modelo de Tamura y Nei (1993) para ambos marcadores moleculares mitocondriales con los parámetros  $I = 0.6950$   $\bar{\gamma} = 0.7210$ , para el Citocromo b y para la Región control un valor de  $I = 0.4550$  y  $\Gamma = 0.3910$ , calculados previamente por jMODELTEST Versión 3.07 (Posadas y Crandall, 1998).

#### 10.5.5 Prueba de neutralidad.

El principal supuesto para poder determinar la estructura y la historia poblacional es que la variación molecular evoluciona de manera neutral. Para probarla se usó la prueba de neutralidad de McDonald-Kreitman (M-K) (McDonald y Kreitman, 1991) en el programa DNASP Versión 3.0 (Rozas y Rozas, 1999), la cual compara las variaciones sinónimas y no sinónimas dentro y entre especies dentro de una región de interés y asume que bajo neutralidad la tasa de sustituciones sinónimas y no sinónimas dentro de la especie debe ser la misma que entre especies. Esta prueba solo fue realizada para el Citocromo b, debido a que es una región codificante, mientras que para regiones no codificantes se asumió que se encuentra bajo neutralidad.

#### 10.5.6 *Análisis de la historia demográfica.*

La expansión demográfica fue inferida calculando  $F_s$  de  $F_u$  y la  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) implementadas en el programa ARLEQUIN Versión 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010), estas pruebas detectan desviaciones en el equilibrio del tamaño poblacional que se interpretan en el contexto de expansión poblacional o cuellos de botella siempre y cuando la hipótesis nula de evolución neutral no sea rechazada. Así mismo, la historia demográfica se determinó empleando una distribución de las diferencias de secuencias pareadas, por medio de un análisis de distribución de desacuerdos o mismatch (Rogers y Harpending, 1992). La frecuencia de pares de individuos seleccionados aleatoriamente para un determinado número de sustituciones nucleotídicas y frecuencias esperadas bajo un modelo de rápida expansión demográfica fue calculada usando ARLEQUIN Versión 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Estas frecuencias esperadas fueron comparadas con las frecuencias observadas. El índice de rugosidad “raggedness” de Harpending se calculó usando 1000 simulaciones coalescentes.

Los parámetros de expansión demográfica ( $t$  en la distribución mismatch),  $\Theta_0$  (tamaño poblacional pre-expansión),  $\Theta_1$  (tamaño poblacional pos-expansión), fueron estimados usando la aproximación lineal generalizada al cuadrado (Schneider y Excoffier, 1999). El tiempo absoluto de expansión poblacional ( $t$ ) fue calculada a través de la relación  $t = \tau/2u$ , donde  $\tau$  mide el tiempo en unidad de  $1/2 \mu$  generación,  $\mu$  es la tasa de mutación por secuencias bajo estudio por generación y  $u$  representa la tasa de mutación para el tamaño de la secuencia bajo estudio (Rogers y Harpending, 1992). Para cada región se utilizaron

dos diferentes tasa de mutación, para el citocromo b, una de 0.84% (Perdices y Doadrio, 2001) y una segunda tasa de 1.52% (Zardoya y Doadrio, 1999) estimada para la misma región en peces de agua dulce. Para la región control la tasa de mutación empleada fue de 3.5%, estimada para el pez *Pleuragramma antarcticum* (Zane *et al.*, 2006) y una segunda tasa de mutación de 12.5% para la especie *Atherinomorus endrachtensis* (Gotoh *et al.*, 2011).

Para determinar procesos de expansión o contracción poblacional y el tiempo en el cual estos eventos ocurrieron, la historia demográfica fue reconstruida usando el método BSP (Bayesian Skyline o Gráficas bayesianas de líneas al cielo, por sus siglas en inglés) para detectar cambios en el tamaño efectivo poblacional a través del tiempo usando BEAST Versión 1.8 (Drummond *et al.*, 2005). Cuatro cadenas independientes de Markov asumiendo un reloj molecular relajado y un modelo coalescente *Bayesian Skyline* fue corrido por 30 millones de generaciones con muestreos cada 10,000 pasos. Los resultados de las cuatro cadenas independientes fueron combinados en LOGCOMBINER Versión 1.8. (Drummond y Rambaut, 2007). Las gráficas *Bayesian Skyline* fueron generadas en TRACER Versión 1.8. (Rambaut y Drummond, 2009).

#### 10.5.7. Tiempos de divergencia

Finalmente, se estimaron los tiempos de divergencia para los principales nodos recuperados en el análisis genealógico, para cada región mitocondrial por separado y para los genes concatenados asumiendo un reloj estricto empleando las tasas de sustitución nucleotídica arriba señaladas. Cuatro cadenas independientes



de Markov fueron corridas 30 millones de generaciones con muestreos cada 10,000 corridas asumiendo un modelo coalescente *Bayesian Skyline* en el programa BEAST Versión 1.8. Los resultados de las cuatro corridas independientes se combinaron en LOGCOMBINER Versión 1.8. (Drummond y Rambaut, 2007). Los árboles producidos por BEAST (Drummond *et al.*, 2005) fueron resumidos a un solo árbol empleando TREEANNOTATOR Versión 1.8 después de un Burn-in de 300 árboles y una probabilidad posterior de 0.05. Finalmente el árbol generado fue visualizado en FIGTREE Versión 1.3.1 (Rambaut, 2006).

## 10.6 ANÁLISIS DE DATOS MICROSATÉLITALES

### 10.6.1 *Equilibrio de Hardy – Weinberg, desequilibrio de ligamiento y alelos nulos.*

Para probar las desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó el valor de  $F_{is}$  de acuerdo con Weir y Cockerham (1984). La significancia estadística para esta prueba se evaluó mediante una prueba exacta de Fisher sin sesgo del valor  $P$  basada en el método de cadenas de Markov (Guo y Thompson, 1992) en el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995), la cual permite detectar la deficiencia de heterocigotos que puede resultar de la presencia de alelos que no amplifican (alelos nulos), con 10,000 demorizaciones, 1000 lotes y 10,000 iteraciones por lote. El procedimiento de la prueba secuencial de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1981) fue usada para ajustar el nivel de significancia a un nivel del 5%. Además, se evaluó el desequilibrio de ligamiento para garantizar la distribución independiente de los alelos en una sola población o en diferentes poblaciones por medio de una relación estadística del log-likelihood (G-test).

Los programas computacionales MICROCHECKER Versión 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) y Freena (Chapuis y Estoup, 2007) fueron usados para estimar la frecuencia de alelos nulos. Además, MICROCHECKER permitió investigar las posibles causas de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, incluyendo la pérdida de datos debido al tartamudeo (“stuttering”), presencia de alelos nulos y pérdida de alelos de mayor tamaño.

#### 10.6.2 *Análisis de agrupamiento*

Es frecuente que un sitio muestreado no necesariamente represente una población biológica (Waples y Gaggiotti, 2006), por tal motivo, para determinar el número efectivo de poblaciones muestreadas, se utilizó un método de agrupamiento basado en un modelo Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE Versión 2 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). Se realizaron corridas independientes desde  $K = 1$  (asumiendo una población panmíctica) a  $K = 6$  (en donde cada localidad geográfica representa una población) asumiendo frecuencias alélicas correlacionadas y un modelo de mezcla. Cada valor de  $K$  fue corrido 2 millones de generaciones de MCMC (Markov Chain Monte Carlo) con un calentamiento inicial de 500 000 generaciones. Se realizaron tres corridas para cada  $K$  para asegurar convergencia de los resultados. Se graficaron la probabilidad de los datos  $[P(D)]$  y el valor estadístico calculado  $\Delta K$  (Evano *et al.*, 2005) el cual mide el punto más alto de la probabilidad de  $K$ . Finalmente, para las  $K$  con probabilidades más altas, se determinó la proporción promedio de los miembros de la población muestreada a los grupos inferidos para cada individuo por medio de un valor de  $Q >$

80%, donde  $Q$  representa para cada individuo el coeficiente de que los miembros estimados dentro de cada agrupamiento genético basado sobre el grado de ancestría que puede ser atribuido a este agrupamiento (Prichard *et al.*, 2000).

### 10.6.3 *Diversidad genética.*

Una vez definidas las poblaciones en STRUCTURE versión 2, la diversidad genética para cada población fue estimada a partir del número de alelos por locus observados ( $n_o$ ) y efectivos ( $n_e$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y estimada ( $H_e$ ) y la heterocigosidad esperada con base en Nei ( $H_{Nei}$ ) (Nei, 1973) usando el programa POPGENE versión 1.31 (Raymond y Rousset, 1995). La riqueza alélica ( $R_A$ ) fue calculada usando el método descrito por Petit *et al.* (1998) en el programa FSTAT (Yeh *et al.*, 1997). Este método permite que el número de alelos sea comparado entre poblaciones independientemente del tamaño de la muestra (Leberg, 2002) y se basa en el menor número de individuos tipificados para cualquier locus.

### 10.6.4 *Estructura poblacional.*

La distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones se analizó a través de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) (Excoffier *et al.*, 1992) basado sobre  $R_{ST}$  y  $F_{ST}$  implementado en ARLEQUIN versión 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Además, la magnitud de la diferenciación genética fue estimando con el valor de la  $R_{ST}$  y  $F_{ST}$  total y pareadas. La significancia estadística fue probada por un análisis de bootstrapping sobre todos los *loci* a un

intervalo de confianza al 95% y un jackknifing sobre todos los *loci* para obtener el error estándar.

Posteriormente se determinó si las poblaciones definidas por STRUCTURE eran genéticamente diferentes a través del cálculo de  $R_{ST}$  debido a que el modelo de evolución para los microsatélites es más cercano al modelo mutacional por saltos (SMM) que al modelo de alelos infinitos (IA), sin embargo, debido al tamaño de la muestra y de los loci analizados también se cuantificó el valor de  $F_{ST}$  basado en Weir y Cockerham (1985). El procedimiento de la prueba secuencial de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1981) fue usada para ajustar el nivel de significancia a un nivel del 5%. Además, se cuantificó el número de migrantes por generación ( $NmR_{ST}$  y  $NmF_{ST}$ ), estos análisis fueron realizados en el programa ARLEQUIN versión 3.5.1.2.

#### *10.6.5 Análisis demográfico.*

El programa BOTTLENECK Version 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1996) fue utilizado para probar la evidencia de expansión demográfica/contracción en cada población. La prueba de Wilcoxon y la prueba de signos bajo el modelo TPM (Two phase model o modelo de dos fases, por sus siglas en inglés) fueron usadas para determinar la presencia de cuellos de botella después de un corrimiento de 10,000 replicas. La prueba de Wilcoxon provee una señal alta para poder detectar cuellos de botella, además esta puede ser usada para pocos loci polimórficos (tan pocos como 4 loci, pero con mucha varianza), aunque se recomienda para tener un alto poder estadístico de 10 – 15 loci y un pequeño número de individuos (15-40 individuos). Debido a que las mutaciones para los microsatélites no llegan a ser consistentes con

alguno de los modelos mutacionales propuestos como el IAM o el SMM, Di Rienzo *et al.* (1994) sugieren el modelo TMP. Este modelo ha sido reportado como aquel que se ajusta mejor a los datos microsatelitales (Luikart *et al.*, 1998).

## 11.RESULTADOS

## 11.1 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE REGIONES MITOCONDRIALES.

### 11.1.1 *Alineamiento de las secuencias.*

Un total de 109 individuos se secuenciaron y analizaron para un fragmento de 1133pb del citocromo b, mientras que para la región control 135 organismos fueron secuenciados y analizados para un fragmento de 341pb. Un número diferente de individuos para cada localidad geográfica fue secuenciado (Tabla 2).

### 11.1.2 *Diversidad genética.*

De las 135 secuencias analizadas para un fragmento de 341pb de la región control se obtuvieron 59 sitios polimórficos, de los cuales 43 fueron parsimoniosamente informativos. Un total de 60 haplotipos fueron resueltos, de los cuales el 63% (38 haplotipos) fueron haplotipos únicos. Para las 103 secuencias analizadas del fragmento de 1133pb del citocromo b se observaron 40 sitios polimórficos, siendo solo 26 parsimoniosamente informativos; 43 haplotipos fueron resueltos, encontrando 31 (72%) haplotipos únicos. No se observaron inserciones o deleciones para ninguna de las regiones estudiadas. Muchos haplotipos presentaron un solo cambio en ambos marcadores. Para la región control solo tres haplotipos fueron compartidos entre individuos de diferentes localidades, y para el citocromo b cuatro haplotipos se compartieron entre individuos de diferentes localidades. Para ambos marcadores se observó la presencia de un haplotipo con mayor frecuencia, para la región control este haplotipo es compartido por 28 individuos de las localidades de Tiacaque, Presa Villa Victoria, Presa Tepuxtepec, Laguna de Zacapu y Laguna de San Juanico, mientras que para el citocromo b el haplotipo más

frecuente solo lo comparten 18 individuos de las localidades de Tiacaque, Presa Villa Victoria y Presa Tepuxtepec.

La diversidad haplotípica total para la región control fue  $h = 0.945$  y la diversidad nucleotídica de  $\pi = 0.03578$ . Para el citocromo b se observó un valor total de  $h = 0.940$  y  $\pi = 0.00505$ . En la región control los valores observados de diversidad haplotípica presentaron un rango desde 0 hasta 0.971 para las localidades de Tiacaque y Laguna de San Pedro Lagunillas respectivamente. Para la diversidad nucleotídica el valor más bajo se presentó en Tiacaque ( $\pi = 0$ ) y el valor más alto en la Laguna de San Juanico ( $\pi = 0.3829$ ). Asimismo, para el citocromo b los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica más bajos se observaron en la localidad de Tiacaque ( $h = 0$ ,  $\pi = 0$ ) y los más altos en la laguna de San Juanico con valores de  $h = 0.962$  y  $\pi = 0.00632$  (Tabla 2).



Tabla 2. Diversidad genética de secuencias del ADN mitocondrial (región control y citocromo b) para *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México.

Clave de la Localidad	n	No. de Haplotipos	Diversidad haplotípica ( $h$ )	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )	n	No. de haplotipos	Diversidad haplotípica ( $h$ )	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )
	Región control				Citocromo b			
T	21	1	0	0	15	1	0	0
VV	20	9	0.789 ( $\pm 0.086$ )	0.0123 ( $\pm 0.00298$ )	8	4	0.643 ( $\pm 0.184$ )	0.00132 ( $\pm 0.00063$ )
Tx	25	12	0.920 ( $\pm 0.029$ )	0.0247 ( $\pm 0.00304$ )	23	10	0.862 ( $\pm 0.057$ )	0.0029 ( $\pm 0.00067$ )
Z	20	9	0.832 ( $\pm 0.063$ )	0.00977 ( $\pm 0.00147$ )	14	7	0.758 ( $\pm 0.116$ )	0.00225 ( $\pm 0.00058$ )
SJ	25	15	0.953 ( $\pm 0.023$ )	0.03829 ( $\pm 0.00182$ )	21	15	0.962 ( $\pm 0.026$ )	0.00632 ( $\pm 0.00042$ )
SP	24	19	0.971 ( $\pm 0.024$ )	0.01687 ( $\pm 0.00332$ )	22	12	0.762 ( $\pm 0.099$ )	0.00204 ( $\pm 0.00057$ )
Total	135	60	0.945	0.03578	103	43	0.940	0.00505

T = Tiacaque, VV= Presa Villa Victoria, Tx = Presa Tepuxtepec, Z = Laguna de Zacapu, SJ = Laguna de San Juanico, SP = Laguna de San Pedro Lagunillas.

### 11.1.3 Análisis genealógico.

Para el análisis de inferencia Bayesiana de los datos concatenados se obtuvieron 20001 árboles de los cuales se descartaron los primeros 2500 árboles como calentamiento, por lo que se construyó un árbol de consenso de mayoría con 17501 árboles (Figura 3). La monofilia del grupo interno fue soportada por los valores de probabilidad posterior (1.0) y bootstrap (100%). El árbol muestra cuatro clados bien soportados por valores de probabilidad posterior o por valores de bootstrap, o bien por ambos. El grupo Tiacaque/Zacapu se encuentra soportado por los valores de probabilidad posterior y bootstrap (0.94 y 74% respectivamente) y está constituido en su mayoría por todos los individuos de las poblaciones de Tiacaque (21

individuos), Laguna de Zacapu (14 individuos), Laguna de San Juanico (4 individuos), Presa Villa Victoria (1 individuo), Presa Tepuxtepec (3 individuos), Laguna de San Pedro Lagunillas (4,18). El clado San Juanico fuertemente soportado y constituido por algunos individuos de la Laguna de San Juanico (6 individuos). El tercer grupo, Tepuxtepec conformado por la mayoría de individuos de la Presa Tepuxtepec (20 individuos) y algunos de la Presa San Juanico (7 individuos). Finalmente, el cuarto grupo conformado solo por individuos de la localidad de San Pedro Lagunillas (21 individuos) está fuertemente soportado por valores de probabilidad posterior y de bootstrap (0.97 y 89% respectivamente).

La red de haplotipos (con 43 haplotipos) para el citocromo b puede ser caracterizada como una topología de estrella en la cual se observan dos grupos, el primero conformado por los haplotipos de localidad de San Pedro Lagunillas y Tepuxtepec, mientras que el segundo grupo lo forman principalmente las localidades de Villa Victoria, Zacapu y Tiacaque, los haplotipos de la Laguna de San Juanico se encuentran repartidos en ambos grupos. Los haplotipos T1 y Tx10 presentaron la mayor distribución geográfica; el primero se presentó en todos los individuos de la localidad de Tiacaque (15 individuos) y con poca frecuencia para las localidades de presa Villa Victoria (1 individuo) y presa Tepuxtepec (2 individuos). El haplotipo Tx10 también se presentó en tres localidades geográficas, en la presa Tepuxtepec (7 individuos), la laguna de Zacapu (1 individuo) y la laguna de San Pedro Lagunillas (1 individuo). Los haplotipos VV3 y Tx3 se presentaron en dos localidades geográficas diferentes, mientras que los haplotipos SP2, SJ16, SJ14, Z2, Tx12, Tx11, Tx4 se presentaron en más de un individuo de la misma localidad geográfica, los 32

haplotipos restantes fueron exclusivos para un solo individuo y por localidad (Figura 4).

Para la región control la red de haplotipos (con 60 haplotipos) exhibe un patrón consistente con una compleja historia demográfica y poca estructura geográfica constituida por una gran cantidad de haplotipos únicos. El haplotipo T1 se encuentra distribuido en cinco de las seis localidades geográficas, presente en todos los individuos de la presa Tiacaque (21 individuos), en la Presa Villa Victoria (1 individuo), Tepuxtepec (3 individuos), Zacapu (1 individuo) y San Juanico (2 individuos). Sólo dos haplotipos más fueron compartidos por individuos de diferentes localidades geográficas (VV1 y SJ2). Un total de 17 haplotipos se presentaron en más de un individuo de la misma localidad y los restantes 38 haplotipos se presentaron en un único individuo (Figura 5).

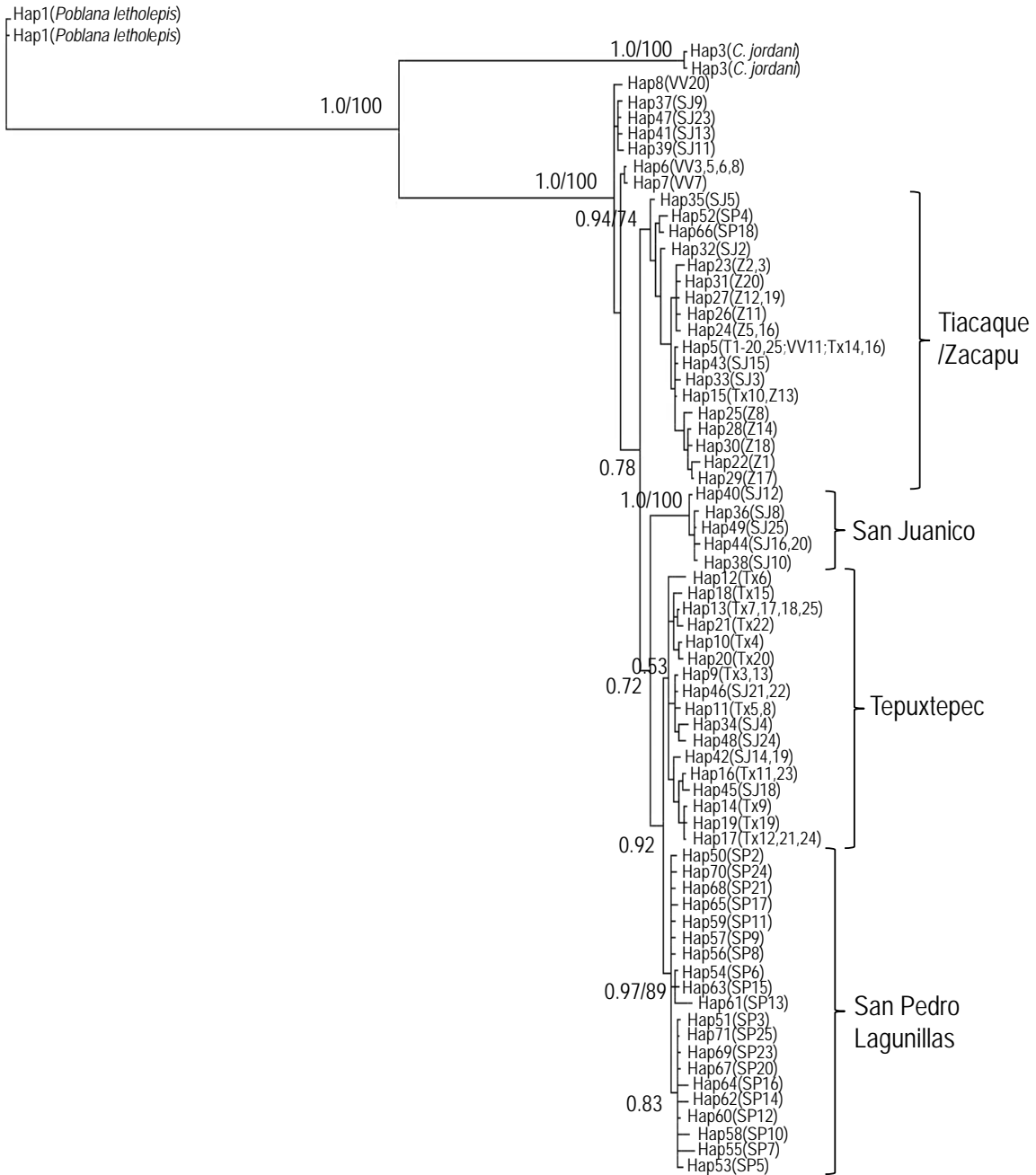


Figura 3. Filograma de consenso de mayoría del análisis Bayesiano del citocromo b y región control concatenados de *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. Se muestran los valores de probabilidad posterior en decimales para los clados principales y posterior a la diagonal los valores de bootstrap. Las abreviaturas

corresponden a los individuos para cada localidad geográfica: T = Tiacaque, VV = Presa Villa Victoria, Z = Laguna de Zacapu, SJ = Presa San Juanico, SP = Laguna de San Pedro.

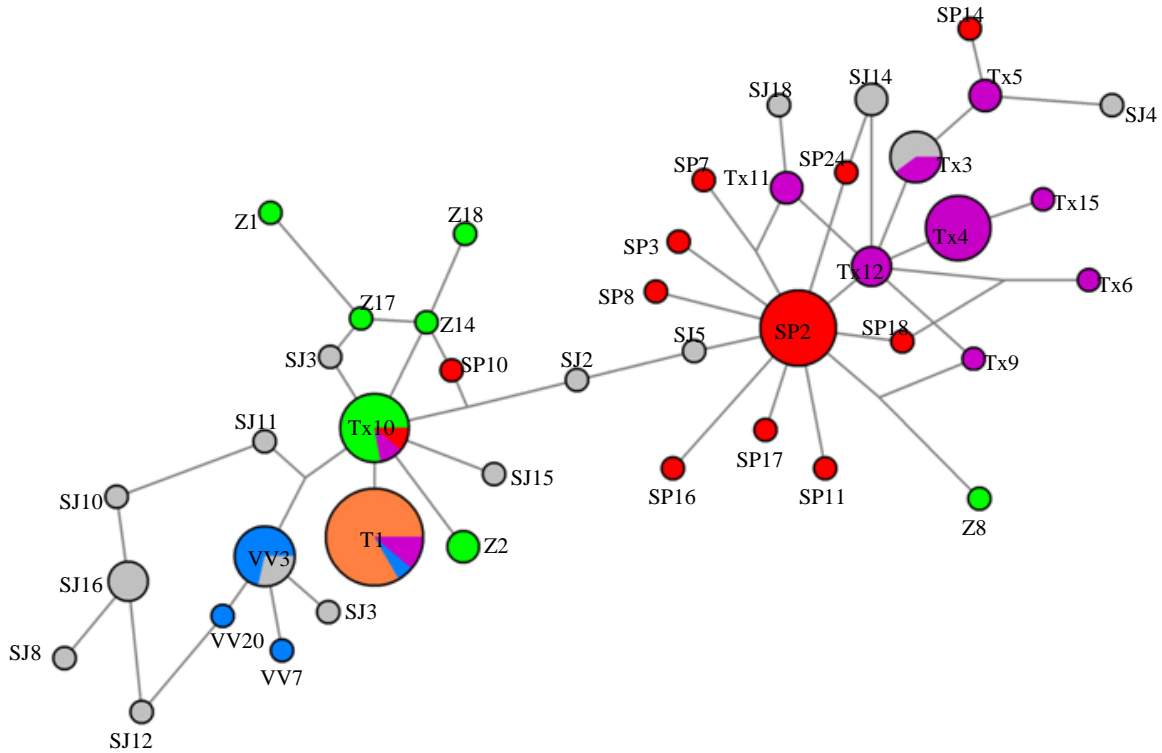


Figura 4. Red de haplotipos construida a partir del método de median-network para el citocromo b a partir de 43 haplotipos de *Chirostoma humboldtianum* de la región central de México. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas diagonales representan el número de mutaciones entre haplotipos. Los colores representan a cada una de las localidades geográficas, Tiacaque (T) en naranja, Presa Tepuxtepec (Tx) en violeta, Presa Villa Victoria (VV) en azul, Laguna de Zacapu (Z) en verde, Laguna de San Juanico (SJ) en gris y Laguna de San Pedro Lagunillas (SP) en rojo.

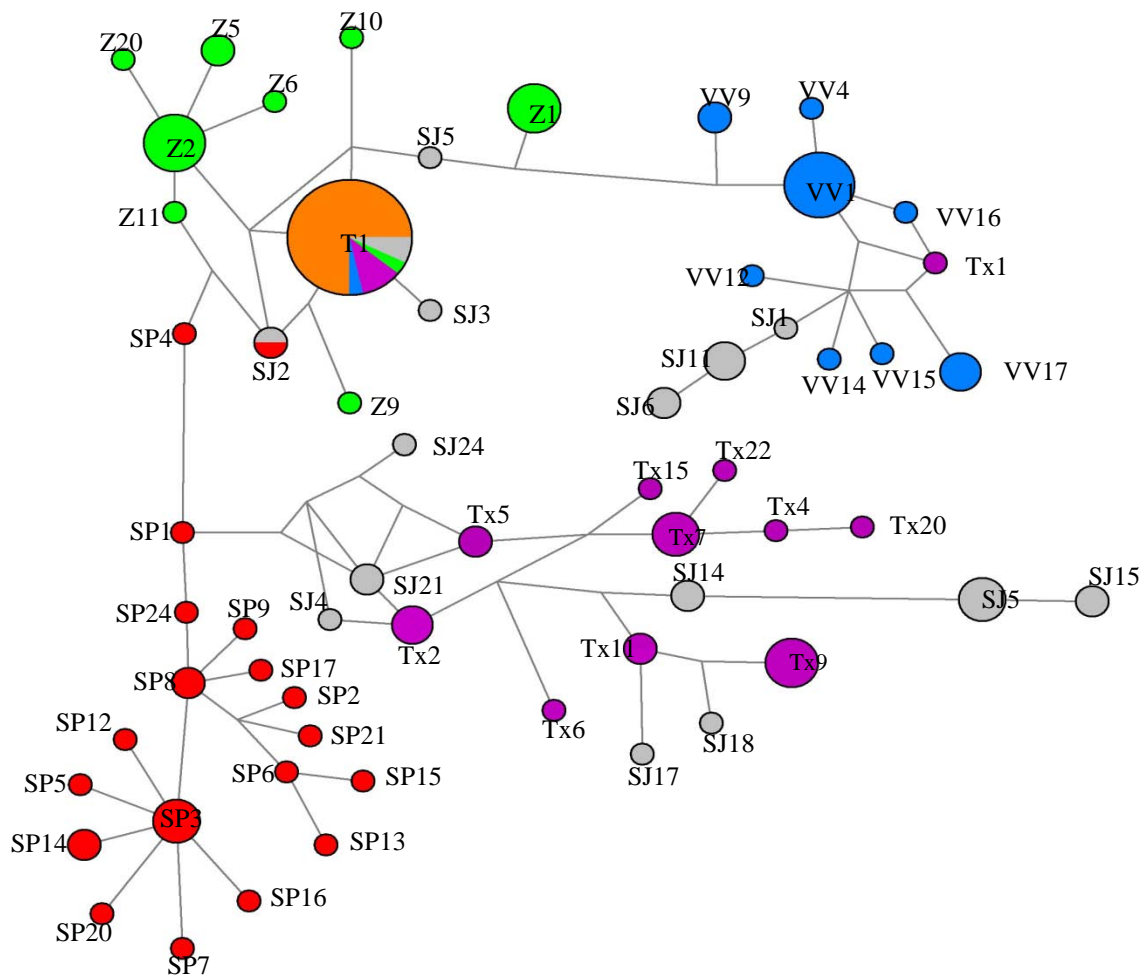


Figura 5. Red de haplotipos construida a partir de del método de median-network para la región control a partir de 60 haplotipos de *Chirostoma humboldtianum*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas diagonales representan el número de mutaciones entre haplotipos. Los colores representan a cada una de las localidades geográficas, Tiacaque (T) en naranja, Presa Tepuxtepec (Tx) en violeta, Presa Villa Victoria (VV) en azul, Laguna de Zacapu (Z) en verde, Laguna de San Juanico (SJ) en gris y Laguna de San Pedro Lagunillas (SP) en rojo.

#### 11.1.4 Estructura genética y diferenciación poblacional.

El análisis de agrupamiento Bayesiano (BAPS) para el citocromo b reveló cuatro grupos genéticos, con una probabilidad marginal logarítmica promedio de -761.1739 después de 6 corridas independientes. El análisis mostró una mezcla de individuos de diferentes localidades geográficas dentro del mismo grupo. Mientras que para la región control BAPS resolvió 5 grupos genéticos con una probabilidad marginal logarítmica promedio de -1577.0058 posterior a 6 corridas independientes. De igual forma como en el agrupamiento para citocromo b, los grupos genéticos para la región control estuvieron conformados por individuos de diferentes localidades geográficas (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis del agrupamiento bayesiano (BAPS) a partir de las secuencias del ADN mitocondrial (citocromo b y región control) para las localidades geográficas donde se muestreo *C. humboldtianum* en la región central de México (el número representan los individuos de cada población que conforman el grupo).

Grupo	Localidades geográficas					
	T	VV	Tx	Z	SJ	SP
Citocromo b						
A	20	1	3	20	2	2
B	---	7	---	---	5	---
C	---	---	20	---	8	20
D	---	---	---	---	6	---
Región control						
A	20	1	3	20	5	2
B	---	19	1	---	6	---
C	---	---	21	---	9	1
D	---	---	---	---	---	21
E	---	---	---	---	6	---

Una vez definidos los grupos con el programa BAPS, se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual mostró que la diversidad genética para el citocromo b fue significativamente distribuida entre grupos (71.36%), la varianza remanente fue distribuida entre localidades geográficas dentro de grupos (4 grupos) y dentro de localidades geográficas (seis localidades geográficas: Tiacaque, Villa Victoria, Tepuxtepec, Zacapu, San Juanico, San Pedro Lagunillas). Así mismo, para la región control el mayor porcentaje de varianza se presentó entre grupos (70.40%), mientras que la restante se presentó entre localidades geográficas dentro de grupos (5 grupos) y dentro de localidades geográficas (seis localidades geográficas) (Tabla 4). Los valores de  $F_{ST}$  estadísticamente significativos muestran que al menos uno de los grupos es genéticamente diferente al resto de los grupos.



Tabla 4. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) a partir de secuencias del ADN mitocondrial (citocromo b y región control) para las seis localidades muestreadas en la región central de México para *C. humboldtianum*. Los valores de significancia asociados a los componentes de la varianza fueron obtenidos después de 10000 aleatorizaciones. (gl = grados de libertad).

Fuente de variación	gl	Suma de Cuadrados	Componentes de la Varianza	% de Varianza	P
Citocromo b					
Entre grupos ( $F_{CT} = 0.4935$ )	3	195.045	2.782	71.36	< 0.001
Entre localidades geográficas dentro de grupos ( $F_{SC} = 0.3254$ )	8	28.178	0.363	9.32	<0.001
Dentro de localidades geográficas ( $F_{ST} = 0.8068$ )	91	68.544	0.753	19.32	< 0.001
Total	102	291.767	3.898		
Región control					
Entre grupos ( $F_{CT} = 0.5415$ )	4	576.125	5.306	70.40	<0.001
Entre localidades geográficas dentro de grupos ( $F_{SC} = 0.3064$ )	9	54.190	0.684	9.07	<0.001
Dentro de localidades geográficas ( $F_{ST} = 0.7947$ )	121	187.211	1.547	20.53	<0.001
Total	134	817.526	7.537		

Todos los valores de  $F_{ST}$  pareados fueron significativos con ambos marcadores mitocondriales. Para el citocromo b el valor más bajo se observó entre la localidad de Villa Victoria y San Juanico ( $F_{ST} = 0.1926$ ), mientras que el valor más

alto se presentó entre las localidades de Villa Victoria y Tiacaque ( $F_{ST} = 0.8589$ ) (Tabla 5). Para la región control los valores de la  $F_{ST}$  presentaron un rango entre 0.1438 para la Presa Tepuxtepec – Laguna de San Juanico, hasta 0.8325 entre Tiacaque – Presa Villa Victoria (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de  $F_{ST}$  pareadas estimados para el citocromo b (debajo de la diagonal) y región control (arriba de la diagonal) para las localidades estudiadas de *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México.

	T	VV	Tx	Z	SJ	SP
T	0	0.8325*	0.6644*	0.5506*	0.5309*	0.8108*
VV	0.8589*	0	0.5709*	0.6876*	0.3283*	0.6961*
Tx	0.7541*	0.6106*	0	0.5630*	0.1438*	0.3236*
Z	0.4859*	0.50766*	0.6303*	0	0.4344*	0.7099*
SJ	0.4358*	0.1926*	0.2448*	0.2932*	0	0.3203*
SP	0.8099*	0.6531*	0.2157*	0.6606*	0.2582*	0

T = Tiacaque; VV = Presa Villa Victoria; Tx = Presa Tepuxtepec; Z = Laguna de Zacapu; SJ = Laguna de San Juanico; SP = Laguna de San Pedro Lagunilla. Valores significativos con \* $P < 0.05$

#### 11.1.5 Prueba de neutralidad.

Los resultados de la prueba de McDonald Kreitman para el Citocromo b mostraron consistencia con un proceso de evolución neutral de las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum*, debido a que la prueba mostró que el cociente entre sustituciones sinónimas y no sinónimas entre las especies (grupo interno y externo) y dentro de las poblaciones no son significativas, la prueba de exactitud de Fisher presentó un valor de  $P = 0.747$ ; la prueba de G con corrección de Williams = 0.157 ( $P = 0.6916$ ) y la prueba de G con corrección de Yates = 0.008 ( $P = 0.926$ ).

#### 11.1.6 Análisis de la historia demográfica.

Con base en lo anterior se asume que todos los cambios genéticos en los marcadores moleculares empleados son neutrales, por lo cual las pruebas  $F_s$  de Fu y  $D$  de Tajima se pueden emplear, ya que respeta la hipótesis subyacente de neutralidad. Los valores de la  $F_s$  de Fu para el citocromo b mostraron un proceso de expansión poblacional para los grupos A, B, C y la muestra total de la especie; sin embargo, la prueba  $D$  de Tajima solo sugiere un proceso de expansión para los grupos A, B y C. El índice de rugosidad mostró valores bajos y no significativos para todos los grupos ( $P > 0.05$ ) (Tabla 6) los cuales sugieren una población constante en el tiempo, con excepción del grupo C.

Los histogramas de la distribución mismatch de los haplotipos obtenidos para el citocromo b presentaron una distribución unimodal para el grupo C, lo cual sugiere un proceso de expansión, una distribución en forma de **L** para los grupos A y B, lo que indica desviación bajo un modelo de expansión poblacional, mientras que para la población total se observó una distribución bimodal (Figura 8). Para el grupo D no se realizó este análisis debido al pequeño número de muestras. El grupo C presentó un tiempo de expansión estimado desde hace 252006 años usando una tasa de mutación de 0.84% y hace 139267 años con una tasa de mutación de 1.52% calculado a partir del valor de  $\tau = 2.3984$  (con un intervalo de confianza al 95% entre 1.707 y 3.035) (Tabla 6). Durante la expansión la población debió haberse incrementado desde un valor de  $\Theta_0$  (0) hasta  $\Theta_1$  (9999) (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros demográficos estimados y prueba de neutralidad empleando las regiones mitocondriales citocromo b y región control para los grupos genéticos obtenidos a partir del análisis de BAPS (Corander *et al.* 2003; 2004) en la especie *Chirostoma humboldtianum* de la región central de México.

Localidades	<i>Fu's F</i>	<i>Tajima's D</i>	<i>Distribución Mismatch</i>				
	<i>F<sub>s</sub></i>	<i>D</i>	$\tau$	$\Theta_0$	$\Theta_1$	<i>SDD</i>	<i>Hri</i>
Citocromo b							
Grupo A	-4.2902*	-1.5303*	0.3105	0	9999.0	0.2399**	0.0332 <sup>ns</sup>
Grupo B	-2.1743*	-1.7779*	0.3457	0	9999.0	0.1873**	0.0525 <sup>ns</sup>
Grupo C	-17.3818**	-1.6047*	2.3984	0	9999.0	0.0147*	0.0813*
Grupo D	-0.8336 <sup>ns</sup>	-1.3369 <sup>ns</sup>	1.9843	0	24.9468	0.0278 <sup>ns</sup>	0.1200 <sup>ns</sup>
Muestra Total	-19.1727**	-0.7488 <sup>ns</sup>	8.609	0	11.7	0.0088 <sup>ns</sup>	0.0121 <sup>ns</sup>
Región control							
Grupo A	-3.1344 <sup>ns</sup>	-0.6961 <sup>ns</sup>	4.7637	0	4.1064	0.048 <sup>ns</sup>	0.1058 <sup>ns</sup>
Grupo B	-2.4768 <sup>ns</sup>	-0.4061 <sup>ns</sup>	5.4589	0	11.947	0.0248 <sup>ns</sup>	0.0546 <sup>ns</sup>
Grupo C	-4.3027 <sup>ns</sup>	-0.2154 <sup>ns</sup>	7.4375	0	23.017	0.0051 <sup>ns</sup>	0.0166 <sup>ns</sup>
Grupo D	-9.8346*	-1.4224*	3.0039	0.8875	59.609	0.0113 <sup>ns</sup>	0.0175 <sup>ns</sup>
Grupo E	1.7231 <sup>ns</sup>	1.0319 <sup>ns</sup>	2.5898	0	2.1339	0.2036 <sup>ns</sup>	0.7866 <sup>ns</sup>
Muestra Total	-20.936*	0.4148 <sup>ns</sup>	16.318	0	39.922	0.0099 <sup>ns</sup>	0.0114 <sup>ns</sup>

*F<sub>s</sub>*, estadístico de Fu; *D*, prueba D de Tajima;  $\tau$ , tiempo desde la expansión expresado en unidades de tiempo mutacional;  $\Theta_0$ , tamaño poblacional pre-expansión;  $\Theta_1$ , tamaño poblacional post-expansión; *SDD*, desviación de la suma de cuadrados, *Hri*, índice de rugosidad de Harpending. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ns = no significativo.

Los histogramas de la distribución mismatch de los haplotipos obtenidos para el citocromo b presentaron una distribución unimodal para el grupo C, lo cual también sugiere un proceso de expansión, una distribución en forma de **L** para los grupos A y B, y bimodal para la muestra total (Figura 6). Para el grupo D no se realizó el análisis de mismatch debido al pequeño número de muestras.

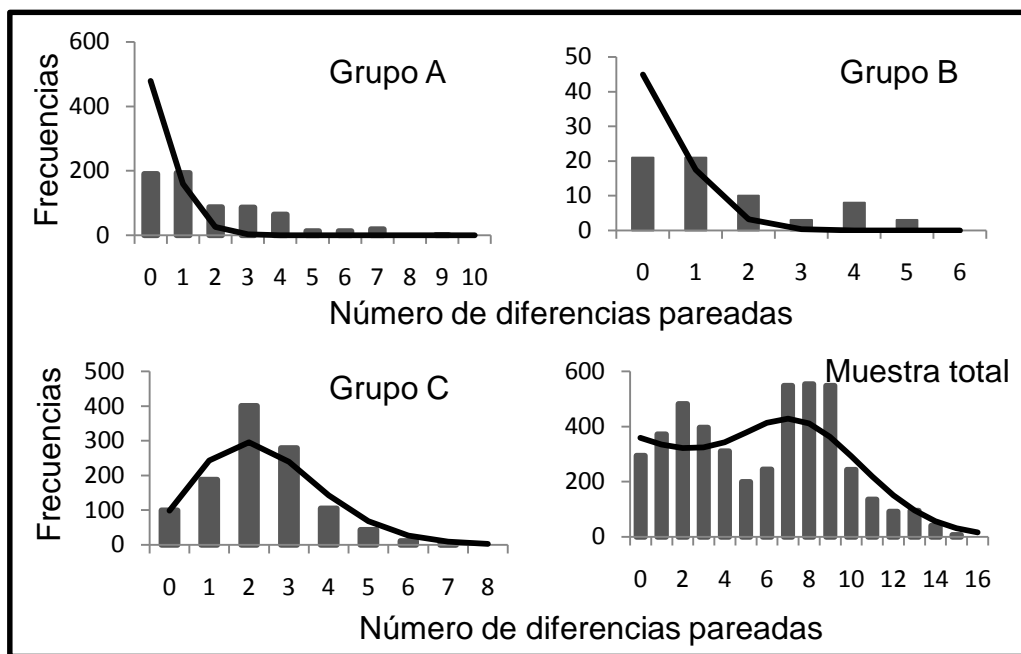


Figura 6. Distribución mismatch para los grupos obtenidos por BAPS (Corander *et al.* 2003, 2004) y la muestra total de *Chirostoma humboldtianum* empleando el gen mitocondrial citocromo b. Las barras grises indican los valores observados y la línea negra muestra la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Para la región control el histograma de la distribución mismatch de la muestra total mostró una distribución bimodal (Figura 7). El grupo A mostró una distribución en forma de **L**, la cual indica que no hay una expansión poblacional. Los grupos B, C

y D mostraron una distribución unimodal sugiriendo un proceso de expansión (Figura 6). Para el grupo E el análisis no se realizó debido a que este grupo está únicamente constituido por 5 individuos y los análisis demográficos pierden validez bajo un tamaño de muestra muy pequeño. En todos los casos el índice de rugosidad ( $r$ ) no fue significativo, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de estacionaridad o población constante. Sin embargo, los valores negativos para la  $D$  de Tajima no fueron significativos. De igual forma, los valores calculados para la  $F_s$  de Fu fueron negativos, y solo mostraron valores significativos para el grupo D, con un tiempo de expansión hace 225,178 años ( $\tau = 3.0039$ ) (Tabla 6). Durante la expansión, la población se incrementó desde  $\Theta_0$  (0.8875) a  $\Theta_1$  (59.609).

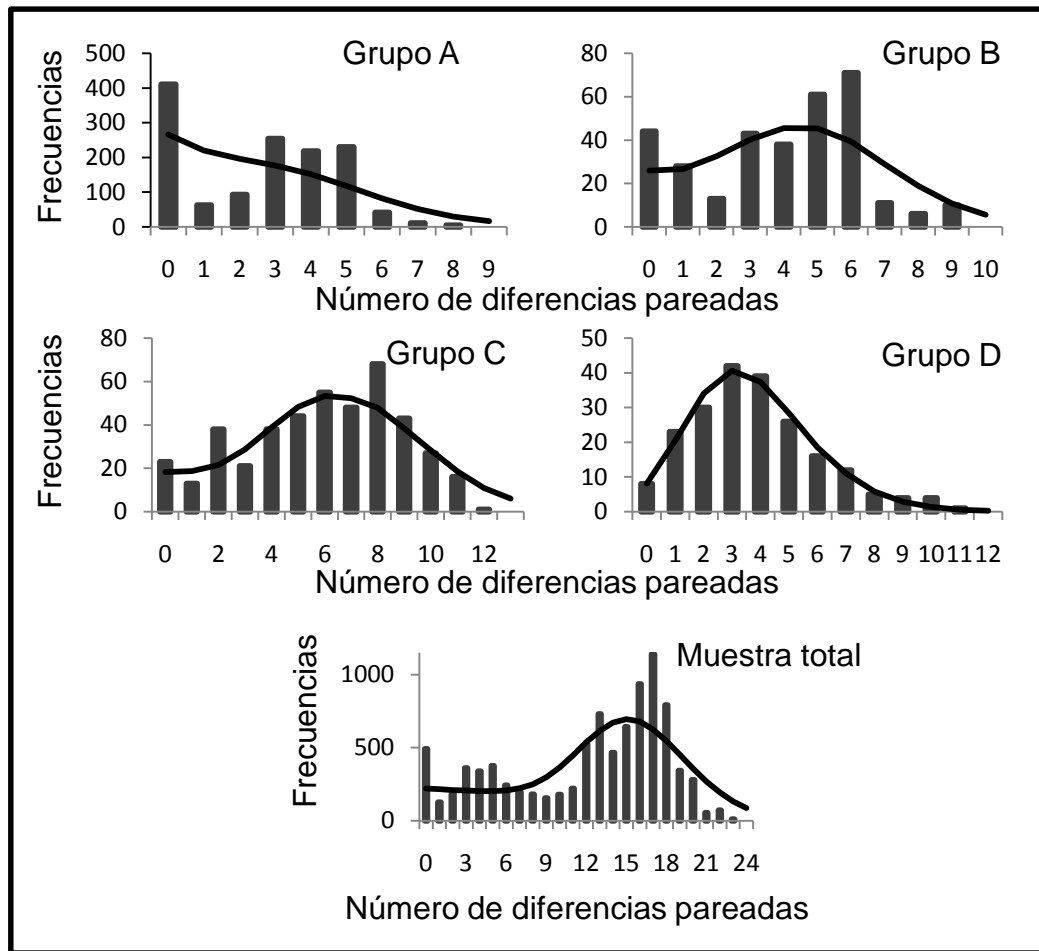


Figura 7. Distribución mismatch para los grupos definidos por BAPS (Corander *et al.* 2003; 2004) y la muestra total de *Chirostoma humboldtianum* utilizando la región control mitocondrial. Las barras grises indican los valores observados y la línea negra muestra la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Debido a que los anteriores análisis muestran incertidumbre, se decidió usar métodos bayesianos para determinar la probabilidad de expansión poblacional. Para el citocromo b empleando una tasa de sustitución nucleotídica de 0.84% el análisis bayesiano de línea al cielo mostró una estabilidad poblacional para los grupos A y C, mientras que para el grupo B se observa un proceso de expansión poblacional en

los últimos 75,000 años aproximadamente; así mismo, el análisis global de la población sugiere expansión poblacional hace 100,000 años (Figura 8).

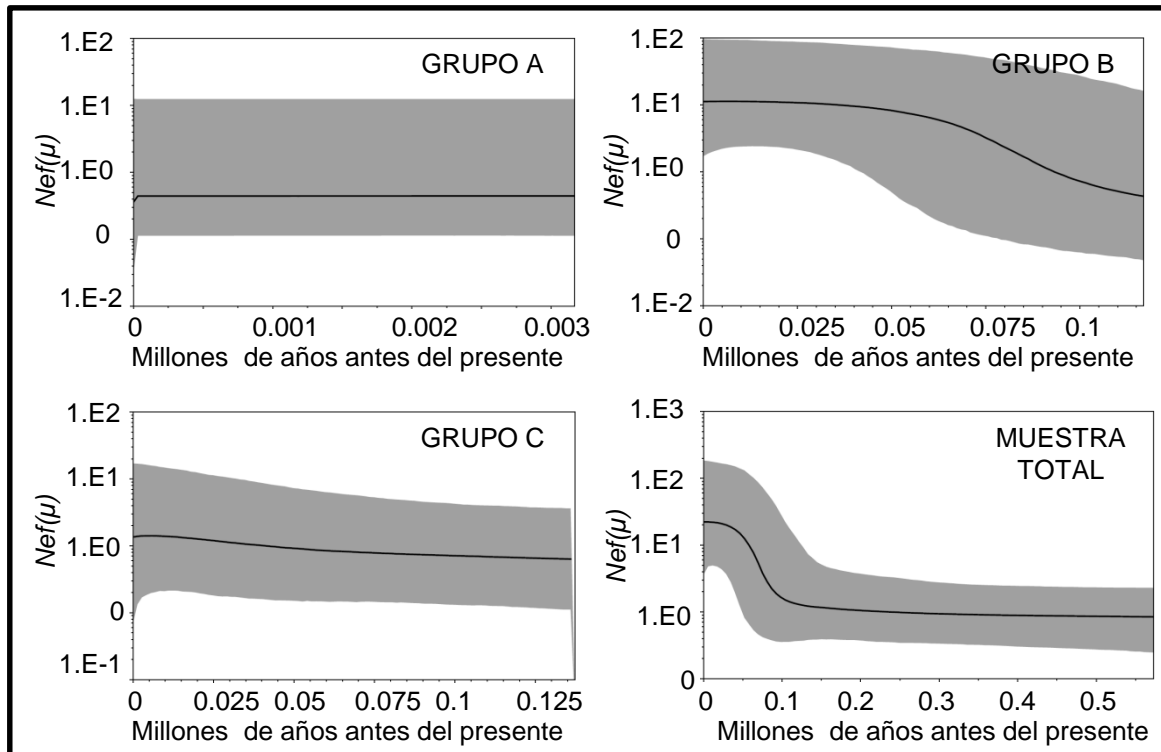


Figura 8. Gráficas bayesianas de línea al cielo para el citocromo b, las cuales muestran el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 0.84% por millón de años para la especie *Chiostoma humboldtianum* en la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

Para este mismo gen con una tasa de sustitución de 1.52% sugiere una estabilidad poblacional para los grupos A y C durante los últimos 20 a 25 mil años. Este mismo análisis sugiere expansión poblacional para el grupo B durante los



últimos 35,000 años aproximadamente; así mismo, el análisis para la muestra total de la especie indica un proceso de expansión durante los últimos 50,000 años (Figura 9).

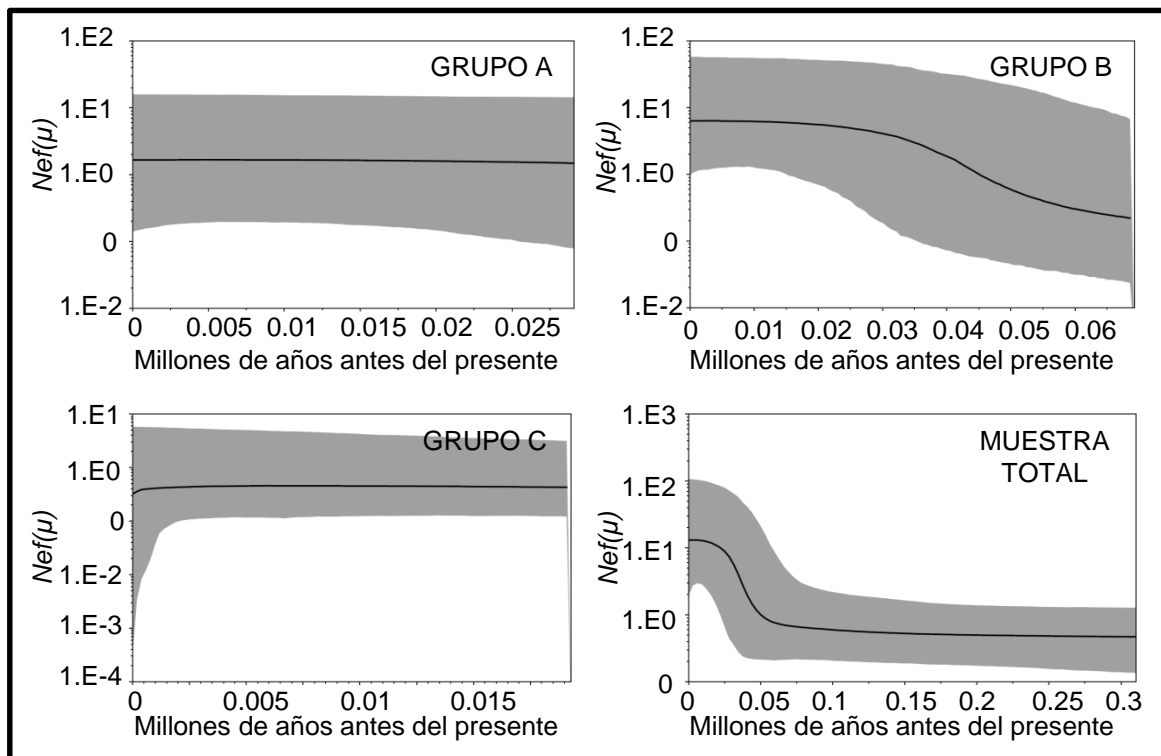


Figura 9. Gráficas bayesianas de línea al cielo para el citocromo b, las cuales muestran el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 1.52% por millón de años para la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

El análisis bayesiano correspondiente a la región control sugiere para el grupo D un proceso de expansión poblacional, observado en los últimos 150,000 a 50,000

años para ambas tasas de sustitución nucleotídica. Los grupos A y B mostraron una estabilidad poblacional en los últimos 200,000 años, así mismo, el grupo C fue estable para los últimos 400,000 años, empleando las dos tasas de sustitución nucleotídica. Para la muestra total se presenta un incremento poblacional empleando la tasa de sustitución nucleotídica de 3.5% para los últimos 250,000 años (Figura 10), sin embargo, empleando la tasa de sustitución de 12.5% el análisis muestra una expansión demográfica en los últimos 100,000 años (Figura 11).

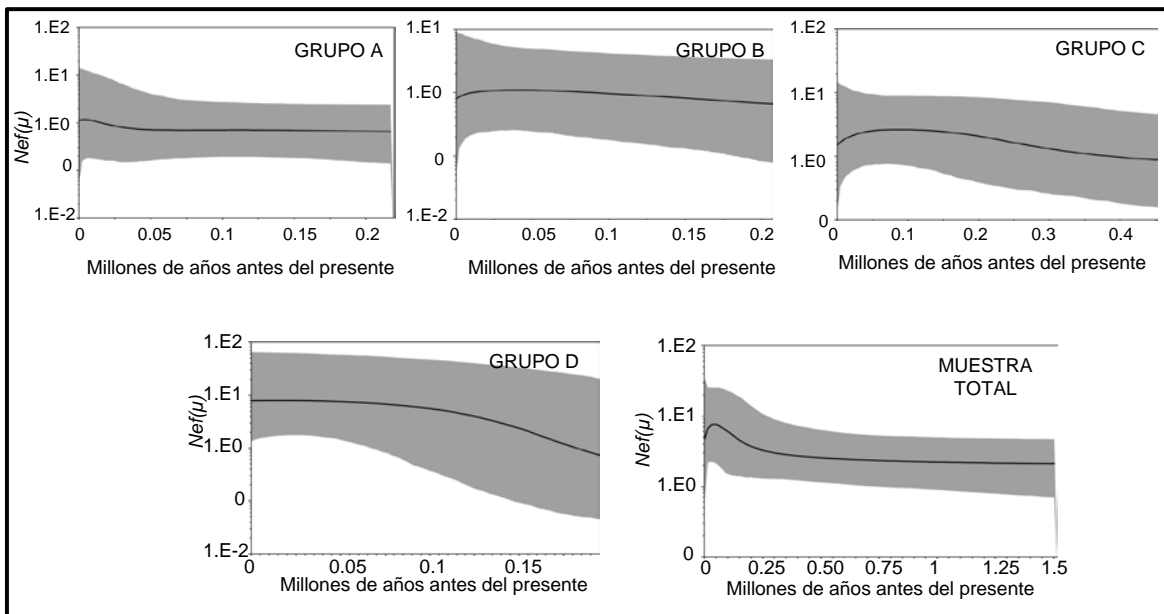


Figura 10. Gráficas bayesianas de línea al cielo para la región control, las cuales muestran el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 3.5% por millón de años para la especie *Chirotoma humboldtianum* de la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

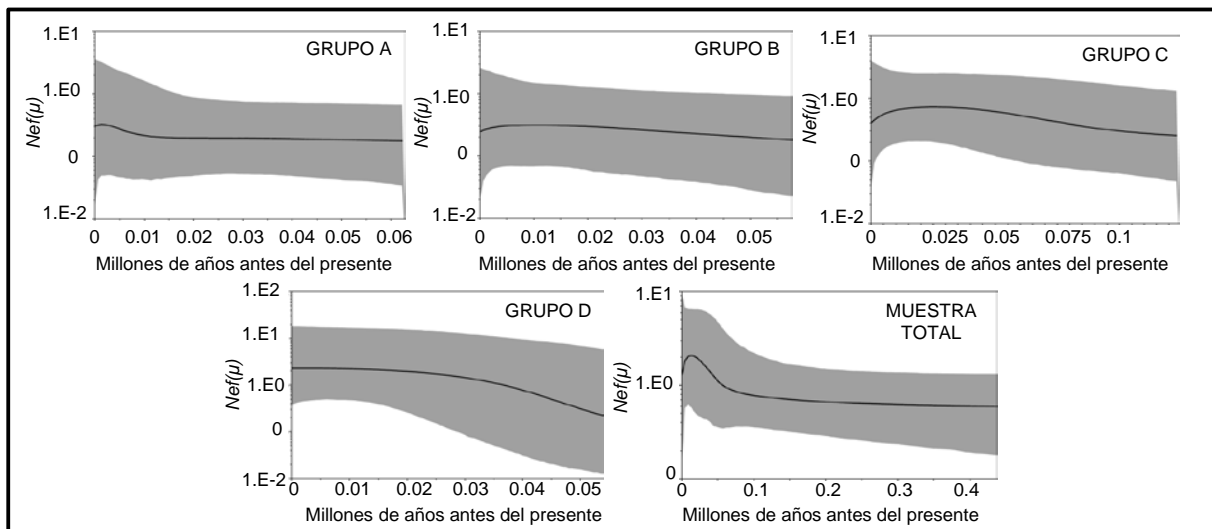


Figura 11. Gráficas bayesianas de línea al cielo para la región control, las cuales muestran el cambio en el tamaño efectivo de la población en el tiempo suponiendo una tasa de divergencia de 12.5% por millón de años para la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. La línea intermedia representa el estimado de la media del tamaño efectivo de la población mientras que los bordes muestran los intervalos al 95% de la densidad posterior más alta (HPD).

#### 11.1.7 Tiempos de divergencia.

El origen de *C. humboldtianum* aparentemente ocurrió entre el Pleistoceno y Plioceno tardío (nodo **A**) (entre ~1.44 y 2.6 m.a.) para la tasa de sustitución de 3.5% y 0.84% para la región control y citocromo b respectivamente, así como para los datos concatenados con las mismas tasas de sustitución nucleotídica. Los valores más altos de sustitución nucleotídica sugieren el origen de la especie entre las glaciaciones Ioniense y Calabriense del Pleistoceno (~0.72-0.83 m.a.) (Figura 14).

Los tiempos de divergencia para los distintos nodos marcados en el árbol poblacional para los tres análisis muestran que estos se ubican en el Pleistoceno (~1.8 m. a.) y la Tarantiense (~ 0.02), también correspondiente al Pleistoceno (Figura 12).

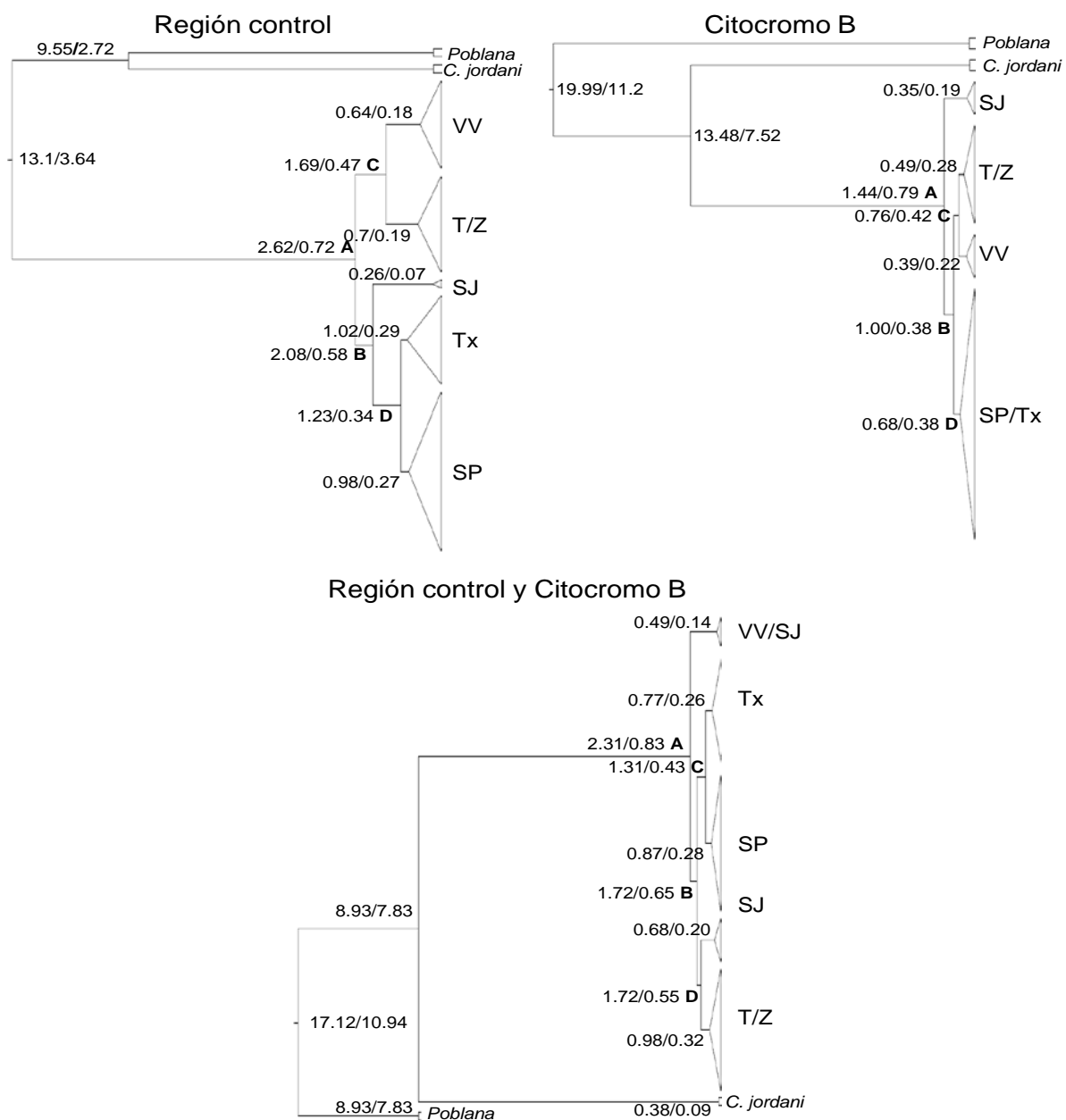


Figura 12. Árboles construidos por inferencia bayesiana usando BEAST (Drumond *et al.*, 2005) para las regiones mitocondriales citocromo b y región control. Se muestran los tiempos de divergencia estimados para los principales nodos. La cifra antes de la diagonal corresponde al tiempo de divergencia usando una tasa de 3.5% para la región control y de 0.84% para el citocromo b. La cifra después de la diagonal indica el tiempo de divergencia empleando la tasa de 12.5% para la región control y 1.52% para el citocromo b.

## 11.2 ANÁLISIS DE MICROSATELITES

### 11.2.1 *Equilibrio de Hardy – Weinberg, desequilibrio de ligamiento y alelos nulos.*

Un total de 288 individuos fueron genotipados con ocho loci microsatelitales. Todos los loci mostraron desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weingber para todas las poblaciones después de la corrección secuencial de Bonferroni (valores significantes de  $F_{IS}$  para una  $\alpha = 0.05$ ,  $k = 8$ ), lo cual se debió a la deficiencia de heterocigotos observada en todos los loci (Tabla 7). El análisis con MICROCHECKER indicó que los alelos nulos fue la causa más probable de deficiencia de heterocigotos. Se presentaron valores significativos en la prueba de ligamiento para los pares de loci Chum48 -Chum78 y Chum48-Chum 387 en la localidad de Zacapu y para el par Chum48-Chum78 para la Laguna de San Pedro Lagunillas, después de la corrección de Bonferroni ( $\alpha = 0.05$ ,  $k = 48$ ).

La presencia de alelos nulos fue observada para todos los locus en las poblaciones de Zacapu, San Juanico y San Pedro Lagunillas, además se observaron en 6 loci para Tiacaque, en 5 loci para Villa Victoria y en 3 loci para Tepuxtepec. En el total de la muestra el 56.25% de los loci mostraron una alta frecuencia de alelos nulos ( $r \geq 0.20$ ), el 33.33% de los loci tiene una frecuencia intermedia de alelos nulos ( $0.05 \geq r \leq 0.02$ ) y solo el 10.42% presentó una frecuencia pequeña de alelos nulos ( $r \leq 0.05$ ). La estimación de  $F_{ST}$  por medio del método de exclusión de alelos nulos (ENA), el cual corrige los posibles efectos que puedan tener la presencia de alelos nulos en los valores de este estimador, para el cual el valor de  $F_{ST-ENA} = 0.2243$  no fue significativamente diferente al valor no corregido  $F_{ST} = 0.1939$ .

### 11.2.2 Análisis de agrupamiento.

La probabilidad máxima para el número de poblaciones ( $K$ ) determinado por STRUCTURE fue para  $L(K) = 6$ ; empleando el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), se observaron picos en  $\Delta K = 6$  y  $\Delta K = 4$ , con el pico más alto en  $\Delta K = 6$  (453) (Figura 13). La gráfica de barras mostró homogeneidad en las poblaciones genéticas, la mayor parte de los individuos pertenecientes a cada cuenca se agruparon de acuerdo a su localidad geográfica con un valor de  $Q > 80\%$  (Figura 14).

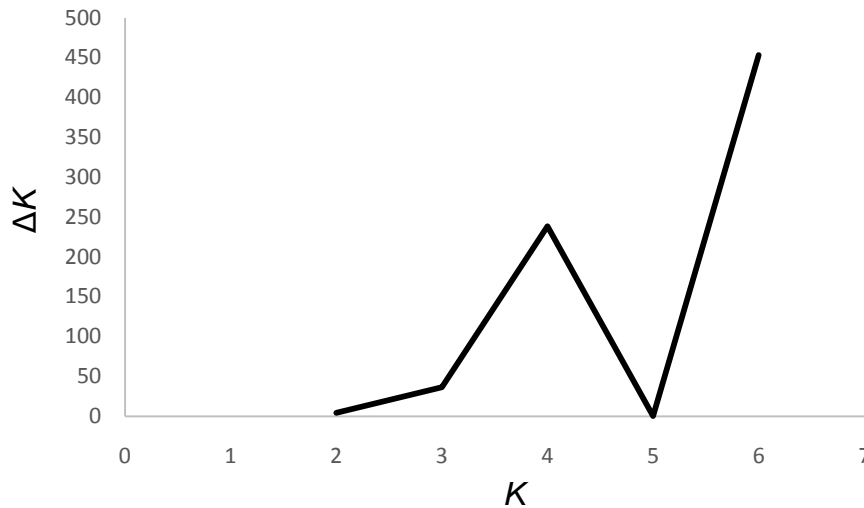


Figura 13. Resultados de STRUCTURE para la máxima probabilidad  $L$  para  $K$ , empleando el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), para un número de poblaciones  $K$  desde uno a seis, para ocho loci microsatelitales de la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. Los picos en  $\Delta K$  se presentaron en  $K = 4$  y  $K = 6$ .

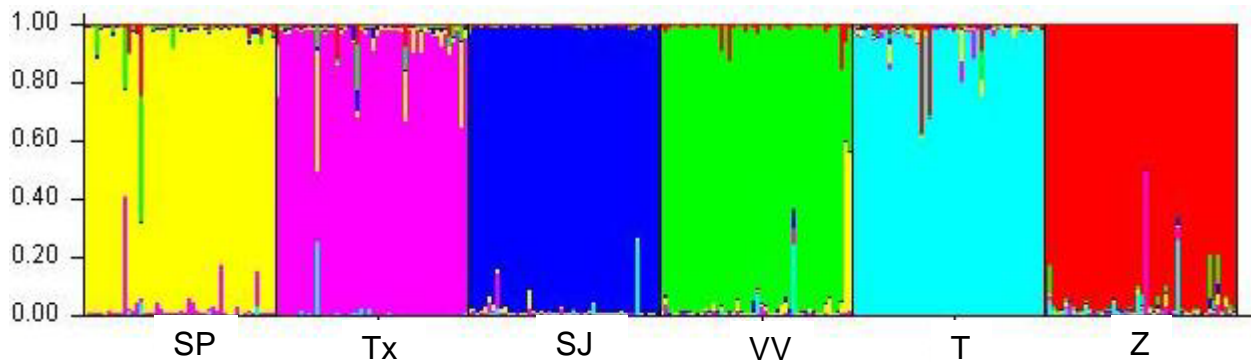


Figura 14. Análisis bayesiano de la estructura genética basada sobre ocho loci de microsatélites para la especie *Chirostoma humboldtianum* en la región central de México. Cada individuo es representado por una línea vertical, la cual es coloreada de acuerdo al grupo asignado para  $K = 6$ .

### 11.2.3 Diversidad genética

Un total de 169 alelos distintos fueron observados para ocho *loci* en la muestra total, con 7 a 26 alelos por cada locus. Todos los *loci* mostraron alelos únicos, para casi todas las poblaciones, el locus Chum496, mostró la mayor cantidad de alelos únicos (14), mientras que el más bajo fue registrado para el locus Chum 411 (1). La población de Tiacaque mostró un total de 11 alelos únicos, Presa Villa Victoria 5, Presa Tepuxtepec 19, Laguna de Zacapu 6, Laguna de San Juanico 13 y Laguna de San Pedro Lagunillas 9. El valor promedio de alelos observados ( $n_o$ ) fue de 21 y el valor promedio de alelos efectivos ( $n_e$ ) fue de 6.52. El valor más alto de  $H_o$  se presentó en la Presa Tepuxtepec (0.45) y el más bajo en la Laguna de Zacapu (0.16) (Tabla 7). La riqueza alélica en la Laguna de Zacapu fue la más baja ( $A_R = 7.91$ ), mientras que la más alta se presentó en la Laguna de San Pedro Lagunillas ( $A_R = 12.78$ ). El valor más bajo de Fis se presentó en la Presa Tepuxtepec (-0.08).

Mientras que el valor más alto en la Laguna de San Pedro Lagunillas, en la mayoría de los casos se observaron deficiencias de heterocigotos (Tabla 7).

Tabla 7. Diversidad genética y alélica por locus microsatélite para las localidades de Tiacaque (T), Presa Villa Victoria (VV), Presa Tepuxtepec (Tx), Laguna de Zacapu (Z), Laguna de San Juanico (SJ), Laguna de San Pedro Lagunillas (SP) de la especie *Chirostoma humboldtuanum* en la región central de México. Fis = índice de consanguinidad, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, H<sub>Nei</sub> = heterocigosidad esperada de Nei y A<sub>R</sub> = Riqueza alélica.

Población/ Estimador	Locus	Locus								Promedio
		Chum48	Chum78	Chum387	Chum496	Chum21	Chum411	Chum450	Chum358	
T	F <sub>is</sub>	<b>0.58</b>	<b>-0.16</b>	<b>0.89</b>	<b>0.87</b>	<b>0.51</b>	<b>0.62</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.55</b>	<b>0.51</b>
	Ho	0.36	0.55	0.06	0.09	0.44	0.26	0.59	0.28	0.33
	He	0.85	0.48	0.59	0.71	0.89	0.57	0.59	0.61	0.66
	H <sub>Nei</sub>	0.85	0.47	0.58	0.69	0.87	0.56	0.59	0.60	0.65
	A <sub>R</sub>	11.79	5.34	4.39	4.95	16.79	4.98	4.90	3.00	9.36
VV	F <sub>is</sub>	<b>0.05</b>	<b>0.55</b>	<b>0.72</b>	<b>0.61</b>	<b>0.74</b>	<b>0.76</b>	<b>0.14</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.44</b>
	Ho	0.74	0.36	0.17	0.26	0.21	0.17	0.53	0.75	0.39
	He	0.78	0.78	0.58	0.65	0.81	0.69	0.62	0.74	0.71
	H <sub>Nei</sub>	0.77	0.77	0.58	0.64	0.80	0.69	0.61	0.73	0.69
	A <sub>R</sub>	10.15	9.18	6.75	3.74	11.99	4.95	3.90	6.52	9.53
Tx	F <sub>is</sub>	<b>-0.08</b>	<b>-0.09</b>	<b>0.44</b>	<b>0.82</b>	<b>-0.41</b>	<b>0.38</b>	<b>0.35</b>	<b>0.26</b>	<b>0.25</b>
	Ho	0.52	0.58	0.41	0.14	0.87	0.34	0.44	0.25	0.45
	He	0.48	0.54	0.73	0.79	0.62	0.55	0.67	0.34	0.59
	H <sub>Nei</sub>	0.48	0.53	0.73	0.78	0.62	0.54	0.66	0.33	0.59
	A <sub>R</sub>	3.99	6.29	6.29	9.15	3.00	4.00	8.40	6.34	7.91
Z	F <sub>is</sub>	<b>0.59</b>	<b>0.54</b>	<b>0.60</b>	<b>0.87</b>	<b>0.95</b>	<b>0.71</b>	<b>0.75</b>	<b>0.48</b>	<b>0.72</b>
	Ho	0.33	0.24	0.26	0.09	0.04	0.19	0.07	0.09	0.16
	He	0.81	0.52	0.64	0.71	0.82	0.66	0.26	0.17	0.57
	H <sub>Nei</sub>	0.79	0.51	0.63	0.71	0.81	0.66	0.26	0.16	0.57
	A <sub>R</sub>	10.80	3.99	7.79	5.85	9.83	4.95	4.81	3.66	8.62
SJ	F <sub>is</sub>	<b>0.49</b>	<b>0.75</b>	<b>0.22</b>	<b>0.66</b>	<b>0.94</b>	<b>0.47</b>	<b>0.57</b>	<b>0.81</b>	<b>0.62</b>
	Ho	0.36	0.14	0.58	0.25	0.05	0.32	0.35	0.17	0.26
	He	0.69	0.54	0.74	0.74	0.74	0.59	0.81	0.88	0.72
	H <sub>Nei</sub>	0.68	0.53	0.73	0.73	0.74	0.58	0.80	0.87	0.71
	A <sub>R</sub>	8.47	9.43	9.29	5.46	5.94	3.00	12.54	12.19	11.05
SP	F <sub>is</sub>	<b>0.55</b>	<b>0.69</b>	<b>0.53</b>	<b>0.40</b>	<b>0.97</b>	<b>0.52</b>	<b>0.41</b>	<b>0.40</b>	<b>0.55</b>
	Ho	0.38	0.10	0.39	0.35	0.02	0.26	0.54	0.54	0.32
	He	0.83	0.33	0.82	0.58	0.82	0.54	0.92	0.90	0.72
	H <sub>Nei</sub>	0.82	0.33	0.81	0.57	0.81	0.53	0.91	0.89	0.71
	A <sub>R</sub>	11.37	4.85	11.85	3.91	10.05	2.99	16.66	14.97	12.76



#### 11.2.4 Estructura poblacional.

El Análisis de Varianza Molecular mostró valores significantes para  $F_{ST}$  (0.252) y  $R_{ST}$  (0.296), los valores de  $NmF_{ST}$  (0.337) y  $NmR_{ST}$  (0.420) fueron bajos. Además, el AMOVA para  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  reveló que el 25.22% y 29.64%, respectivamente, de la variación total fue significativamente distribuida entre poblaciones y la varianza remanente (74.78% y 70.36%, para  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ ) se encuentra distribuida dentro de las poblaciones (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de Varianza Molecular basado sobre  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  para las poblaciones de *Chiostoma humboldtianum* de la región central de México, empleando ocho loci microsatelitales.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	% de Varianza	<i>P</i>
$F_{ST}$					
Entre poblaciones ( $F_{ST} = 0.252$ )	5	153.019	0.30924	25.22	<0.001
Entre individuos dentro de poblaciones	570	522.656	0.91694	74.78	
Total	575	675.675	1.22618		
$R_{ST}$					
Entre poblaciones ( $R_{ST} = 0.296$ )	5	161288.330	327.91	29.64	<0.001
Entre individuos dentro de poblaciones	570	443647.750	778.33	70.36	
Total	575	604936.08	1106.24		

El valor más alto de la  $F_{ST}$  pareada se observó entre el par Tiacaque – Presa Tepuxtepec (0.3946) y el menor valor se observó entre el par Laguna de San Juanico

– Laguna de San Pedro Lagunillas (0.085), todos los valores fueron estadísticamente significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni ( $\alpha = 0.05$ ,  $k = 15$ ) . Para  $R_{ST}$  pareada se observó entre el par Tiacaque – Presa Tepuxtepec (0.3946) y el menor valor se observó entre el par Laguna de San Juanico – Laguna de San Pedro Lagunillas, solo dos valores fueron estadísticamente no significativos después de la corrección de Bonferroni ( $\alpha = 0.05$ ,  $k = 15$ ) (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de  $F_{ST}$  pareadas (debajo de la diagonal) y de  $R_{ST}$  pareadas (arriba de la diagonal), para las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum*.

	T	VV	Z	Tx	SJ	SP
T	0	0.685*	0.116*	0.291*	0.338*	0.381*
VV	0.2092*	0	0.611*	0.380*	0.275*	0.197*
Z	0.3151*	0.2274*	0	0.115*	0.224*	0.255*
Tx	0.3946*	0.3369*	0.1284*	0	0.057*	0.049
SJ	0.2302*	0.2421*	0.2668*	0.3581*	0	0.008
SP	0.2114*	0.1637*	0.2498*	0.3521*	0.085*	0

\*  $P < 0.05$  posterior a la corrección secuencial de Bonferroni

#### 11.2.5 Historia demográfica

La prueba de Wilcoxon y prueba de signos bajo el modelo mutacional de dos fases (TPM), no mostraron un exceso significativo de heterocigotos, lo cual indica ausencia de cuellos de botella en las poblaciones de *C. humboldtianum* en el pasado reciente. La excepción la constituye la población de Tepuxtepec para la prueba de signos o “sign test” que indica un exceso de  $H_e$ ,  $P < 0.009$ . Las gráficas cualitativas mostraron una distribución normal en forma de **L** de las frecuencias alélicas, lo cual

soporta la ausencia de cuellos de botella en las poblaciones de *C. humboldtianum* (Figura 15).

Tabla 10. Pruebas para determinar cuellos de botella para las poblaciones de *Chirostoma humboldtianum* de la región central de México, empleando ocho loci de microsatélites.

Población	Bajo el modelo TPM		
	Prueba de signos		Prueba de Wilcoxon (Exceso de $H_e$ )
	No. esperado de loci con exceso de $H_e$	Valor de $P$	Valor de $P$
Tiacaque	4.73	0.055	0.902
Presa Villa Victoria	4.73	0.188	0.902
Presa Tepuxtepec	4.72	0.009	0.986
Laguna de Zacapu	4.73	0.056	0.994
Laguna de San Juanico	4.72	0.429	0.875
Laguna de San Pedro	4.7	0.434	0.875
Lagunillas			

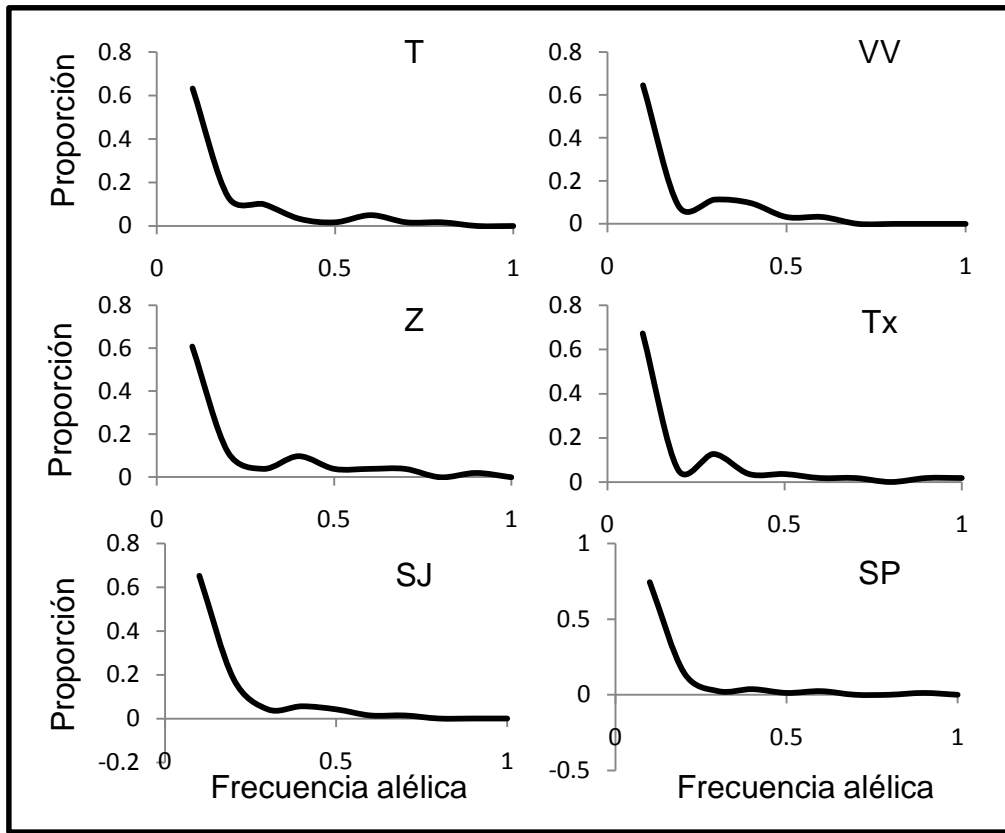


Figura 15. Gráficas del análisis de modo de cambio (mode shift) mostrando la distribución en forma de L de las frecuencias alélicas para ocho loci de microsatélites en las poblaciones de *C. humboldtianum* de la región central de México. Donde: T = Tiacaque, VV = Presa Villa Victoria, Z = Laguna de Zacapu, Tx = Presa Tepuxtepec, SJ = Laguna de San Juanico, SP = Laguna de San Pedro Lagunillas.

## 12.DISCUSIÓN

## ADN Mitocondrial

Los peces de agua dulce generalmente exhiben niveles bajos de diversidad genética en comparación con los peces marinos (Ward *et al.*, 1994). En este trabajo *C. humboldtianum* presentó un número relativamente alto de haplotipos, 60 para la región control y 43 para el citocromo b, en 135 y 103 especímenes analizados respectivamente, de los cuales el 63% fueron haplotipos únicos para la región control y el 72% en el citocromo b. Además, para la región control se presentaron valores promedio relativamente altos de diversidad haplotípica y nucleotídica ( $h = 0.938$  and  $\pi = 0.035$ ). Para otras especies de peces de agua dulce, valores bajos de diversidad genética han sido reportados usando esta misma región mitocondrial. Por ejemplo, en peces que viven en cenotes (*Poecilia orri* y *Gambusia yucatanana*), Vázquez-Domínguez *et al.* (2009) resolvieron 5 haplotipos en 56 individuos y la diversidad haplotípica y nucleotídica promedio fue de 0.15 y 0.001 respectivamente; en el atherinomorfo, *Atherinomorus endrachtensis*, Gotoh *et al.* (2011) encontraron 72 haplotipos en 205 individuos,  $h = 0.151-0.593$  y  $\pi = 0.00026 - 0.0029$ , mientras que para la especie relativamente cercana *Odontestes argentinensis*, Beherengaray & Sunnuck (2001) reportaron valores de  $h = 0.85 - 0.94$  and  $\pi = 0.014 - 0.01$ , los cuales ellos consideran altos. Para el citocromo b la diversidad haplotípica promedio fue alta ( $h = 0.940$ ), sin embargo, la diversidad nucleotídica promedio fue baja (0.005), en comparación con otros peces, para los cuales se han considerado estos valores de diversidad nucleotídica bajos para peces de agua dulce y peces marinos (Grant y Bowen, 1998). En general para la especie ambos marcadores mitocondriales mostraron concordancia en los valores de diversidad haplotípica, la cual fue considerada como alta. Sin

embargo, los valores de diversidad nucleotídica muestran discordancias, debido a que el valor promedio para la región control fue alto y para el citocromo b fue bajo, esto puede estar en relación a la tasa de sustitución nucleotídica que presenta cada uno de los marcadores mitocondriales. Algunos estudios realizados con humanos y ballenas han mostrado que la tasa de sustitución de la región control es 10 veces más alta que la tasa de sustitución para regiones codificantes (Santos *et al.*, 2008, Alter y Palumbi, 2009). Así mismo, la hipervariabilidad y saturación en la región control pueden resultar en la sobrestimación de la verdadera tasa de mutación (Alter y Palumbi, 2009) y mostrar diferencias en los valores de diversidad genética.

Grant y Bowen (1998) han señalado que los valores de diversidad haplotípica altas ( $h$ ) y nucleotídica baja ( $\pi$ ) como los observados para *Chirostoma humboldtianum* empleando el citocromo b en este estudio (Tabla 2), pueden estar relacionados con cuellos de botella poblacionales, seguidas por un rápido crecimiento poblacional y acumulación de mutaciones (Grant y Bowen, 1998), lo cual también se observó en la red de haplotipos empleando el mismo marcador mitocondrial (Figura 4). Este tipo de red es característica en poblaciones que han experimentado una reciente expansión poblacional (Avice, 2000). La hipótesis de una expansión repentina para la población total también fue soportada por el valor negativo de la  $F_s$  de  $F_u$ . Nuestros resultados para los análisis demográficos sugieren que la expansión ocurrió entre el Pleistoceno medio y Pleistoceno tardío. Por ejemplo, para el grupo D (el cual está constituido por haplotipos de San Pedro Lagunillas) la gráfica bayesiana de línea al cielo sugiere expansión en los últimos 150,000 a 50,000 años, correspondiente con el Pleistoceno medio, época en la cual la región oeste del Eje Volcánico Transmexicano presentó mayor humedad que el este (Bradbury, 1997), y en la cual la actividad volcánica y

tectónica fue más intensa en la Mesa Central causando el desbordamiento de la Laguna del Chapala hacia el Río Grande de Santiago y el posterior aislamiento en de estas regiones (Barbour, 1973a; Miller *et al.*, 2005).

Las oscilaciones climáticas relacionadas con las glaciaciones del Pleistoceno causaron muchos ciclos de contracción de rangos geográficos durante periodos fríos y expansión durante subsecuentes periodos cálidos (Ferrari *et al.*, 1999; Israde-Alcántara & Garduño-Monroy, 1999; Bradbury, 2000). En relación con lo anterior, el análisis global de mismatch (bimodal) (Figura 6) para ambos marcadores mitocondriales sugieren múltiples eventos coalescentes recientes (expansiones y contracciones históricas) (Marjoram y Donnelly, 1994; Ray, *et al.* 2003). Las gráficas Bayesianas de línea al cielo para la población total con ambos marcadores mitocondriales también soportan la hipótesis de un rápido crecimiento poblacional para *C. humboldtianum* ocurrido entre el Pleistoceno medio y Pleistoceno tardío (Figura 8 y 9).

Por otro lado, los valores altos de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad haplotípica ( $h$ ) presentes en la región control (Tabla 1), muestra características asociadas a poblaciones estables con una larga historia evolutiva, o bien, una mezcla poblacional de diferentes linajes (Grant y Bowen, 1998). El análisis genealógico no soporta una larga historia evolutiva para la especie, debido a la ausencia de profundidad en las ramas entre los haplotipos (Figura 5). Otros estudios indican que *C. humboldtianum* es una especie reciente (Barbour, 1973a y b, Echelle y Echelle, 1984) que diversificó aproximadamente hace 0.52 Ma. (Pleistoceno medio) de acuerdo a Bloom *et al.* (2013), sin embargo, en este estudio los valores estimados de diversificación del grupo fueron calculados entre 2.62 y 0.72 Ma., los cuales



corresponden con el Plioceno tardío y Pleistoceno temprano (Figura 12). La diferencia encontrada entre el tiempo de diversificación de nuestro estudio y el de Bloom *et al.* (2013), puede estar en relación a las tasas de sustitución nucleotídica que se emplearon en este estudio y las cuales no son específicas para el grupo.

Debido a que no es soportada la hipótesis de que la especie es parte de un linaje con una larga historia evolutiva que se ha mantenido estable; la hipótesis de mezcla de poblaciones de linajes previamente diferenciados es más probable para la especie, debido a que cada sitio de muestreo consiste de haplotipos compartidos entre los diferentes grupos soportados por nuestro análisis bayesiano (Tabla 3) (Figura 3). Además, los valores de  $F_{ST}$  revelan una menor diferenciación genética entre poblaciones más alejadas y una mayor diferenciación entre las más próximas (Tabla 5 y 9). Si bien, la menor diferenciación genética entre poblaciones más alejadas puede ser atribuido a una posible translocación de individuos, debido a que se ha señalado que durante la década de los 70's las translocaciones de especies de "peces blancos" y charales fueron llevados a diversos cuerpos de agua de Michoacán y Estado de México (Rosas, 1976), en la cual se incluye la Laguna de San Juanico. Actualmente, Soto-Galera (per.com. Laboratorio de Bioconservación y Manejo) reporta la presencia de *C. humboldtianum* en esta laguna. De igual forma, la presencia de la especie en la Laguna de Zacapu ha sido referida por diversos autores como parte de su distribución original (Paulo-Maya *et al.*, 2000; Barbour, 1973a; Álvarez, 1963), sin embargo, Medina Nava (1997) señala que la especie fue introducida en este cuerpo de agua. Además, algunos testimonios de pescadores e investigadores señalan la introducción de *Chirostoma humboldtianum* de la Laguna de Zacapu hacía la Laguna de Pátzcuaro y la siembra de pescado blanco principalmente en cuerpos de agua del estado de Michoacán, entre

estos: Tacámbaro, San Juanico, Zitácuaro, entre otros, y en algunos otros estados como Morelos, Oaxaca, Nayarit y Sinaloa (SAGARPA, 2003). La especie ha sido también reportada en el lago de Chapala, Pátzcuaro y Zirahuén en otros trabajos (Barriga-Sosa *et al.*, 2002; Alaye, 1993; Álvarez y Navarro, 1957; Barbour, 1973b), cuando originalmente estos cuerpos de agua no formaban parte de su distribución original.

Además, los valores más altos de diferenciación genética encontrados entre poblaciones próximas como es el caso del par Tiacaque – Villa Victoria, podrían ser atribuidos a los eventos históricos ocurridos en esta región. Si bien, ambos cuerpos de agua se encuentran en el Valle de México y a pesar de que se ha señalado que la distribución de *C. humboldtianum* es exclusiva del sistema Lerma-Santiago y sus afluentes, cabe señalar que la localidad geográfica de Villa Victoria se localiza en el Cutzamala, perteneciente a la cuenca del Balsas. A finales del Plioceno y principios del Pleistoceno la formación de la Mesa Central permitió que los cuerpos de agua del Valle de México vaciaran sus aguas al Balsas, a través de dos drenajes principales, provocando el desplazamiento de peces dentro de este sistema, este suceso histórico ha sido sugerido también para algunas especies de goodeidos compartidos entre la cuenca del Balsas y, lagos y ríos de la Mesa Central (Domínguez-Domínguez, 2004). Esta conexión que permitía la conectividad entre el Valle de México y la cuenca del Balsas fue cerrada entre el Pleistoceno tardío y Holoceno temprano (Barbour, 1973a; Álvarez & Moncayo, 1976) por la formación de una barrera volcánica en el extremo sur del Valle de México (Barbour, 1973b). A pesar de que los tiempos de divergencia estimados para *C. humboldtianum* con ambos marcadores mitocondriales en este trabajo, corresponden con el Pleistoceno (Figura 12), es difícil determinar de manera

puntual los tiempos de separación entre los cuerpos de agua en los cuales se distribuye nuestra especie. Si bien, el análisis de diferenciación genética muestra diferenciación significativa entre estos cuerpos de agua, el análisis genealógico y el análisis de agrupamiento muestran grupos heterogéneos, conformados por haplotipos pertenecientes a distintas regiones geográficas, lo cual puede ser una consecuencia de las translocaciones.

Algunos estudios realizados para góndidos y parásitos de estos en la región Central de México también han mostrado valores altos de  $F_{ST}$  entre poblaciones que se encuentran en la misma cuenca o muy próximas (Domínguez-Domínguez *et al.* 2008; Mejía-Madrid *et al.* 2007), lo cual ha sido atribuido a la compleja historia geológica de la Mesa Central. De igual forma trabajos relacionados con la ictiofauna de la región central de México han señalado diversos periodos de aislamiento y reconexión poblacional (Barbour, 1973a; Israde-Alcantara y Garduño-Monroy, 1999; Moncayo – Estrada, 2001; Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al.* 2006), relacionados con los periodos glaciares e inter-glaciares y con los periodos tectó-volcánicos, conformaron un sistema hidrológico muy complejo. En este sentido Domínguez – Domínguez y Vázquez - Domínguez (2009) han señalado que para especies que habitan regiones con alta actividad tecto volcánica o paleoclimática, o cuyo aislamiento es relativamente reciente es muy complejo identificar los procesos que han moldeado los patrones de divergencia poblacional. Sin embargo, para *C. humboldtianum*, los eventos históricos (climáticos y geomorfológicos) que determinaron la distribución geográfica de sus poblaciones, podría no ser el único factor determinante para su distribución geográfica, debido a que las translocaciones realizadas en las últimas cuatro décadas podrían complicar la interpretación de los datos con el objetivo

de precisar como los eventos geológicos y climáticos han moldeado la historia evolutiva de la especie.

### *Microsatélites.*

Los marcadores microsatelitales mostraron desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todos los loci para todas las poblaciones, lo cual puede ser atribuido a la deficiencia de heterocigotos presente en la mayoría de los casos. La deficiencia de heterocigotos puede ser atribuida a diferentes causas, errores de lectura, presencia de alelos nulos, endogamia, efecto Wahlund, deriva génica. El error en la lectura puede darse por la mala interpretación de un artefacto como pico o banda como un verdadero alelo microsatelital e incluirlo dentro del genotipo, interpretación incorrecta de “stutter” y contaminación. Otra causa es la presencia de alelos nulos la cual puede ser la causa más probable de deficiencia de heterocigotos, debido a que el análisis con MICROCHECKER sugiere su presencia en la mayoría de las poblaciones. A pesar de que la presencia de alelos nulos no se observó en todas las poblaciones ni en todos los loci, esta podría ser la causa más probable de déficit de heterocigotos. Otra causa puede ser la deriva génica que es un evento azaroso que llega a ser menos importante en poblaciones grandes, por lo que la magnitud de frecuencias alélicas cambia cada generación dependiendo sobre el tamaño de la población (Hart y Clark, 1989). Los estimadores de la diversidad genética mostraron valores bajos de riqueza alélica en comparación con otros peces (Osborne *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010), lo que podría indicar que las poblaciones no son tan grandes y que posiblemente la deriva génica si esté afectando considerablemente. Además, se ha señalado que la sobreexplotación de las poblaciones de *Chirostoma* han reducido su tamaño poblacional, en conjunto con la

contaminación y la introducción de especies exóticas, sin embargo, esto no necesariamente indica que el tamaño efectivo de la población también sea reducido. La endogamia podría ser otra de las causas de la deficiencia de heterocigotos, la cual también ha sido sugerida para otras especies del género (Barriga – Sosa *et al.*, 2004).

Otra causa de un déficit de heterocigotos puede ser atribuida al efecto Wahlund (Wahlund, 1928), la cual es causada por subestructuración poblacional no detectada, debido a que la frecuencia de alelos en dos subpoblaciones sin mezclar es diferente a la frecuencia promedio de estas si se tomaran y analizaran como una sola entidad poblacional, es decir que al interior de cada una de las localidades geográficas haya estructuración genética y que se encuentre más de una población dentro de estas. La dimensión de estas lagunas y presas es variable, por ejemplo, la Laguna de Zacapu tiene una superficie de 0.494km<sup>2</sup> (Correa *et al.*, 1974); la Presa Tepuxtepec tiene una superficie de 80km de longitud y 15 a 30 km de ancho (Mena – Hernández *et al.*, 2010). Posiblemente para los cuerpos de agua con mayores extensiones se podrían observar subpoblaciones al interior, sin embargo, el análisis bayesiano de agrupación sugiere que cada cuerpo de agua representa una población. El programa STRUCTURE asume que dentro de las poblaciones los loci deben estar en equilibrio de Hardy – Weinberg y equilibrio de ligamiento, sin embargo, los datos microsatélites obtenidos en este estudio indican que todos los loci están en desequilibrio de Hardy – Weinberg, por lo que la validez del agrupamiento debe ser tomado con reserva. Sin embargo, la estructura fue soportada por el análisis de AMOVA y las  $F_{ST}$  pareadas, el cual muestra diferenciación genética significativa (Tabla 8 y 9).

El desequilibrio de ligamiento gamético entre algunos loci (es la asociación no aleatoria entre alelos de diferentes loci) puede estar asociado a una mezcla poblacional,

selección o bien, ligamiento físico entre los loci (Batley *et al.*, 2004). Posiblemente la idea de una mezcla poblacional sea muy factible, debido a que esto también fue sugerido por los datos mitocondriales y refuerza la idea de que las translocaciones de pez blanco podrían estar afectando la estructura poblacional. Además, la exogamia observada en algunos loci para las poblaciones de Tiacaque, Presa Villa Victoria y Presa Tepuxtepec puede ser atribuida a la hibridación, en este sentido, la presencia de organismo poliploides ha sido reportada para esta última población (com. per. Urbina Sánchez, Laboratorio de genética y biología molecular).

Los eventos de cuellos de botella pueden estar asociados a disturbios y pérdida del hábitat causado por actividad humana, lo cual resulta en un pequeño tamaño poblacional causando desviaciones al HWE. A pesar de que *C. humboldtianum* ha sido designada como una especie estable (Lyons *et al.* 1998), diversos autores han señalado la disminución del tamaño de sus poblaciones y la extirpación de la especie en algunas cuencas, como en el lago de Xochimilco; desde hace más de seis décadas como consecuencia de la introducción de especies exóticas, destrucción del hábitat, contaminación y eutroficación (Álvarez, 1972; Barbour, 1973b; Lyons *et al.* 1998). Sin embargo, la prueba de Wilcoxon, la prueba de signos y las gráficas de modo de cambio (mode shift) bajo el modelo TPM no apoyan la presencia de un cuello de botella reciente, con excepción de la Presa Tepuxtepec para la prueba de signos (Tabla 10), lo cual indicaría una reducción en el tamaño efectivo de esta población.

## 13. CONCLUSIÓN

1. Los marcadores mitocondriales (citocromo b, región control) y los 8 loci de microsatélites, mostraron diferenciación genética significativa entre los distintos sitios de muestreo. Sin embargo, aunque también se detectó la presencia de grupos heterogeneos, es decir, grupos conformados por haplotipos pertenecientes a diferentes regiones geográficas, es difícil discernir si dicho patrón es consecuencia de eventos de translocación realizadas para esta y otras especies de peces blanco, o en efecto, a los eventos geológicos y climáticos ocurridos en esta región durante el Plio – Pleistoceno.
2. Los eventos de aislamiento y expansión poblacional observados con los genes mitocondriales corresponden con el Pleistoceno. Sin embargo, esa mismas señales también pudieron ser causadas por factores antropogenicos, tales como la translocación e hibridación



## 14. LITERATURA CITADA

1. Alaye, R. N. 1993. El pescado blanco (género *Chirostoma*) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Composición de especies, México, Instituto Nacional de la Pesca, *Ciencia Pesquera* 9: 113 - 128.
2. Alaye, R. N. 1996. Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México, Instituto Nacional de la Pesca, *Ciencia Pesquera* 13: 10 - 17.
3. Aljanabi, S.M. y I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25 (22): 4692-4693.
4. Álvarez, J. 1963. Ictiología Michoacana III. Los peces de San Juanico y de Tocumbo, Michoacán. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 12 (1-4): 111-138.
5. Álvarez, J. y M. E. Moncayo. 1976. Contribución a la paleoictiología de la Cuenca de México. *Anales del Instituto Nacional de Antropología e Historia* 6: 191-242.
6. Álvarez, J y L. Navarro. 1957. *Los peces del valle de México*. Secretaría de Marina, Instituto Nacional de Pesca, Dirección de Pesca e Industrias Conexas, México, D.F. 62p.
7. Arthur J. D., P. Bond, E. Lane, F. R. Rupert, T. M. Scott. 1994. Florida's global wandering through the geological eras. In: Lane E, editor. Florida's geological history and geological resources. Special Publication no. 35. Tallahassee (FL): Florida Geological Survey. P. 11 - 25.
8. Avise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Second edition. Sinauer Associates Inc. MA, USA. 541 p.

9. Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447 pp.
10. Avise, J. C., J. E. Neigel y J. Arnold. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal Molecular and Evolution* 20: 99-723.
11. Bandelt, H. J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median – joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.
12. Barbour, C.D. 1973a. A Biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A Species Flock from the Mexican Plateau. *Copeia* 1973 (3): 533-556.
13. Barbour, C.D. 1973b. The systematic and evolution of the genus *Chirostoma* Swaison (Pisces: Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany* 18 (3): 97-141.
14. Barbour, C. D. y B. Chernoff. 1985. Comparative morphology and morphometrics of the pescados blancos (genus *Chirostoma*) from Lake Chapala, México. Pp. 111-127, in A. A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of fish Species Flock*. University of Marine Press, Orono.
15. Barriga – Sosa, I. D. L. A. 2001. Variabilidad morfométrica, merística y Molecular de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae), Tesis doctorado en ciencias biológicas. UAM Iztapalapa, 199pp.
16. Barriga-Sosa, I. D. L. A., A. L. Ibáñez-Aguirre y J. L. Arredondo Figueroa. 2002. Morphological and genetic variation in seven species of the endangered

- Chirostoma* "humboldtianum species group" (Atheriniformes: Atherinopsidae).  
*Revista de Biología Tropical* 50 (1): 199-216.
17. Barriga-Sosa, I. D. L. A., L. E. Eguiarte y J. L. Arredondo Figueroa. 2004. Low but Significant subdivision among Populations of *Chirostoma grandocule* from Lake Patzcuaro, México. *Biotropica* 36 (1): 85-98.
18. Beheregaray L. B. y P. Sunnucks. 2001. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish. *Molecular Ecology* 10: 2849 – 2866.
19. Bernatchez, L. y C. C. Wilson. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7: 431- 452.
20. Bloom, D. D., J. T. Weir, K. R. Piller y N. R. Lovejoy. 2013. Do freshwater fishes diversify faster than marine fishes? A test using state-dependent diversification analysis and molecular phylogenetics of New World silversides (Atherinopsidae). *Evolution* 67(7): 2040 – 2057.
21. Bloom, D. D., P. J., Unmack, A. E., Gosztonyi, K. R., Piller y N. R. Lovejoy. 2012. It's a family matter: molecular phylogenetics of Atheriniformes and the polyphyly of the surf silversides (family: Notocheiridae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(3): 1025–30.
22. Bloom, D. D., K. R. Piller, J. Lyons, N. Mercado-Silva y M. Medin-Nava. 2009. Systematics and Biogeography of the silverside tribe Menidiini (Teleostomi: Atherinopsidae) Based on the Mitochondrial ND2 gene. *Copeia* 2: 408-417.
23. Bradbury, J.P. 2000. Limnologic history of Lago de Patzcuaro, Michoacan, Mexico for the past 48000 years: Impacts of climate and man. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 163(1–2): 69-95.

24. Bradbury, J. P. 1997. Sources of glacial moisture in Mesoamerica. *Quaternary International* 43/44: 97 – 110.
25. Chacón - Torres, A y C. Rosas – Monge. 1995. A restoration plan for pez blanco in lake Pátzcuaro, México. American Fisheries Society Symposium. 15: 122-126.
26. Chapuis, M. P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-631.
27. Corander J., P. Waldmann, P. Marttinen y M.J. Sillanpaa. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20: 2363–2369.
28. Corander J, P. Waldmann y M.J. Sillanpaa. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367–374.
29. Correa, P. G., T. Vargas, H. Hernández, C. Arreola, N. Correa, R. L. Maderey, M. Cervantes de Valdés y C. Reyna. 1974. Geografía del Estado de Michoacán. 1 Geografía Física. Gobierno del Estado de Michoacán, EDISA, México. 454pp.
30. Cornuet, J. M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
31. Cruzan M. B. y A. R. Templeton. 2000. Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution* 15:491–496
32. Dawson, A.G. 1992. Ice age Earth: late Quaternary geology and climate. Routledge, London

33. Doadrio, I. y O. Domínguez. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 (2): 416-430.
34. Domínguez-Domínguez, O., F. Alda, G. Pérez-Ponce de León, J.L. García-Garitagoitia y I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* Bean, 1898 (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. *BMC Evolutionary Biology* 8: 161.
35. Drummond, A. J. y A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214 doi: 10.1186/1471-2148-7-214.
36. Drummond, A. J., A. Rambaut, A. Shapiro y O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5): 1185-1192.
37. Dyer, B.S. y B. Chernoff. 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Zoological Journal Linnean Society, London* 117: 1-69.
38. Echelle, A. A. y A. F. Echelle. 1984. Evolutionary genetics of a species flock: Atherinid fishes on the Mesa Central of México. In *Evolution of fish species flocks* edited by: Echelle A. A. & I. Kornfield. Orono, University of Maine; 93-110.
39. Evanno, G. S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
40. Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.

41. Excoffier, L. y S. Schneider. 1999. Why hunter-gatherer populations do not show sign of Pleistocene demographic expansions. *Proceeding of the Naturalist Academy of Sciences*. USA 96 (10): 10597-10602.
42. Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quatro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131 (2): 479-491.
43. Farias, I. P., G. Ortíz, I. Sampaio, H. Schneider y A. Meyer. 2001. The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular and Evolution* 53:89–103.
44. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
45. Ferrari, L., M. López-Martínez, G. Aguirre-Díaz y G. Carrasco-Núñez. 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central México: from the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27 (4): 303-306.
46. Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation* 126: 131-140.
47. Fu, Y. X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147 (2):915-925.
48. García De León, F. J., J. P. Ramírez – Herrejón, R. García – Ortega y D. A. Hendrickson. 2014. Foraging patterns of four sympatric species of silversides (Atheriniformes: Atherinopsidae) in Lago de Pátzcuaro, Central Mexico. *Research Journal of the Costa Rica, Distance Education University*. 6 (1): 127 – 139.

49. García – Martínez, R. M., F. J. García De León, O. Mejía e I. D. L. A. Barriga – Sosa. 2014. Isolation and characterization of microsatellite loci in the “charal de Xochimilco” *Chirostoma humboldtianum*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 1282 – 1284.
50. Gotoh, R. O., S. N. Chiba, T. V. Goto, H. B. Tamate y N. Hanzawa. Population genetic structure of the striped silverside, *Atherinomorus endrachtensis* (Atherinidae, Atheriniformes, Teleostei), inhabiting marine lakes and adjacent lagoon in Palau: marine lakes are “Islands” for marine species. *Genes and Genetic Systems* 86: 325-337.
51. Grant, B. R. y B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons of conservation. *The Journal of Heredity* 89 (5):415-426.
52. Guo, S. W., y E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
53. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
54. Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66 (4):591-600.
55. Hewitt, G. 1996. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
56. Hewitt G.M. 2004. The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1: 4.



57. Irwin D.M., T.D., Kocher y A. C., Wilson. 1991. Evolution of cytochrome *b* gene in mammals. *Journal of Molecular Biology and Evolution* 2:13–34
58. Israde-Alcántara, I. y V. H. Gaduño-Monroy. 1999. Lacustrine record in a volcanic intra-arc setting: the evolution of late Neogene Cuitzeo basin system (central-western México, Michoacán). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 151: 209-227.
59. Israde-Alcántara, I. 1997. Neogene diatoms of cuitzeo lake central sector of the Trans-Mexican Volcanic Belt and their relationship with the volcano-tectonic evolution. *Quaternary International* 43/44: 137-143.
60. Kim, W. J., K. K. Kim, H. S. Han, B. H. Nam, Y. O. Kim, H. J. Kong, J. K. Noth y M. Yoon. 2010. Population structure of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Korea inferred from microsatellite marker analysis. *Journal of Fish Biology* 76: 1958 – 1971.
61. Lee, W.J., J. Coroy, W. H. Howell y T. D. Kocher. 1995. Structure and evolution of fish mitochondrial control regions. *Journal Molecular Evolution* 41:54–66.
62. Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSp ver. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11): 1451-1452.
63. Loew, S. S., D. F. Williams, K. Ralls, K. Pilgrim, y R. C. Fleischer. 2005. Population structure and genetic variation in the endangered giant kangaroo rat (*Dipodomys ingens*). *Conservation Genetics* 6:495–510.
64. Lovejoy N. R. y M. L. G. de Araujo. 2000. Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology* 9(3):259–268

65. Lyons J., G. González-Hernández, E. Soto-Galera y M. Guzmán-Arroyo. 1998. Decline of Freshwater fishes and fisheries in selected drainages of west-central Mexico. *Fisheries Managements* 23(4): 10-18.
66. Marjoram, P. y P. Donnelly. 1994. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics* 136 (2): 673 – 683.
67. Mateos, M., O. I. Sanjur y R. C. Vrijenhoek. 2002. Historical biogeography of livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution* 56(5): 972-984.
68. Medina Nava, M. 1997. Ictiofauna de la subcuenca del Río Angulo cuenca del Lerma-Chapala, Michoacán. *Zoología Informa* 35: 25-52.
69. Mena-Hernández, U., O. E. Nava – Tristán e I. E. Arzola Nuño. 2010. Análisis de estabilidad de la presa “Tepuxtepec”. Boletín IIE
70. Metcalfe, S. E. 2006. Late quaternary environments of the northern deserts and central transvolcanic belt of Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 93: 258 – 273.
71. Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Biochemistry and molecular biology of fishes vol. 2, editado por: Hochachka and Mommsen. Elsevier Science Publishers B. V.
72. Meyer A y C. Wilson. 1990 Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *Journal of Molecular and Evolution* 31:359–364
73. Miller, R. R., W. L. Minckley y S. M. Norris. 2005. *Freshwater Fishes of México*. The University of Chicago Press. Chicago. 490 p.

74. Miller, R. R. 1986. Composition and derivation of the freshwater fish fauna of México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 30: 121-155.
75. Miller, R. R. y B. Chernoff. 1979. What is *Menidia*? Annual Meeting American Society of Ichthyology and Herpetology. 59: 253 (resumen).
76. Miller, R. R. y M. L. Smith. 1986. Origin and geography of the fishes of Central México. In: C.H. Hocutt & E.O. Wiley (Eds.). *Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley & Sons, New York, pp. 487-517.
77. Moncayo-Estrada, R., I. Israde-Alcántara y V. H. Garduño-Monroy. 2001. La cherehuita *Hubbsina Turneri* De Buen (1941) (Pisces: Goodeidae). Origen, distribución y uso de la regionalización de la cuenca del Lerma. *Hidrobiológica* 11(1): 1-18.
78. Mulcahy, D. G. y J. R. Mendelson. 2000. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17 (2): 173-189.
79. Official Mexican Standar NOM-059-Semarnat-2001. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, México. Diciembre. 77pp.
80. Osborne, M. J., S. R. Davenport, C. W. Hoagstrom y T. F. Turner. 2010. Genetic effective size,  $N_e$ , tracks density in a small freshwater cyprinid, Pecos bluntnose shiner (*Notropis simus pecosensis*), *Molecular Ecology* 19: 2832 – 2844.
81. Paulo-Maya, J., G. Figueroa Lucero y M. Soria-Barreto. 2000. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX. *Chiostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zoología Informa* 43: 59-74.
82. Pérez-Ramírez, M.Y. 2005. Discriminación morfológica, molecular y determinación de la variación genética de peces blancos (Pisces:

- Atherinopsidae). Tesis de Maestría en Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa, México. 88 pp.
83. Perdices, A., Doadrio, I., 2001. The molecular systematic and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19: 468–478.
84. Pitchar, V. L., K. Jones y D. E. Cowley. 2007. Estimation of introgression in cutthroat trout populations using microsatellites. *Conservation Genetics* 8: 1311-1329.
85. Pitchard, J. K., M. Stephen, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
86. Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
87. Rambaut, A. y A. J. Drummond. 2009. Tracer v1.5. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
88. Ray, N., M. Currat y L. Excoffier. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20(1): 76 – 86.
89. Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2.): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
90. Rogers, A. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9 (3): 552-559.
91. Rosas, M.M. 1976. Datos biológicos de la Ictiofauna del Lago de Pátzcuaro con especial énfasis en la alimentación de sus especies. *Memorias del simposio*

*sobre pesquerías en aguas continentales*. Tuxtla Gutiérrez, Chis. Tomo II. *Instituto Nacional de Pesca*. México, pp. 299-366.

92. Saccone C., M. Attimonelli y E. Sbisa'. 1987. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular and Evolution* 26:205–211
93. Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-25.
94. Saeed, B., W. Ivantsoff y L. E. L. M. Crowley. 1994. Systematic relationships of atheriniform families within Division I of the Series Atherinomorpha (Acanthopterygii) with relevant historical perspectives. *Journal of Ichthyology* 34 (9): 27-72.
95. Saunders, M. A. y S. V. Edwards. 2000. Dynamics and Phylogenetic Implications of MtDNA Control Region Sequences in New World Jays (Aves: Corvidae). *Journal of Molecular and Evolution* 51:97–109.
96. Schönhuth M.S. e I. Doadrio. 2003. Phylogenetic relationships of Mexican minnows of the genus *Notropis* (Actinopterygii: Cyprinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 80:323-337.
97. Selkoe, K. A. y Tooner, R. J. 2006. Microsatellites por ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite marker. *Ecology Letters*, 9: 615 – 629.
98. Soria-Barreto, M y J. Paulo-Maya. 2005. Morfometría comparada del aparato mandibular en especies de *Chirostoma* (Atheriniformes: Atherinopsidae) del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Hidrobiológica* 15 (2 especial): 161-168.

99. Soto-Galera, E., E. Díaz-Pardo, E. López-López y J. Lyons. 1998. Fish as indicators of environmental quality in the Río Lerma Basin, México. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 1: 267-276.
100. Swofford, D. L. 1998. *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Ver. 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
101. Tamayo, J. L. y R. C. West. 1964. Surface Configuration and Associated Geology of Middle America. In: Wauchope R. & R.C. West (Eds.). *Handbook of Middle American Indians*. Univ. Texas Press, Austin, pp. 84-121.
102. Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10 (3): 512-526.
103. Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (1): 253-262
104. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
105. Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538
106. Vázquez-Domínguez, E., A. Hernández-Valdés, A. Rojas-Santoyo y L. Sambrano. 2009. Contrasting genetic structure in two codistributed freshwater fishes species of highly seasonal systems. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 181-192.

107. Waples, R. S. 1995. Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the endangered species act. *American Fisheries Society Symposium* 17: 8-27.
108. Ward, R. D., M. Woodward y D. O. F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal Fish Biology* 44: 213-232.
109. Webb, S. A., J. A. Graves, C. Macias-Garcia, A. E. Magurran, D. Ó Foighil y M. G. Ritchie. 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular phylogenetics and Evolution* 30: 527-544.
110. Zane, L., S. Marcato, L. Bargelloni, E. Bortolotto, C. Papetti, M. Simonato, V. Varotto & T. Patarnello. 2006. Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. *Molecular Ecology* 15 (14): 4499-4511.
111. Zardoya, R. e I. Doadrio. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49: 227-237.
112. Zhang D. X. y G. M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12 (3): 563 – 584.

## 15. ANEXO



## 15.1. ANEXO 1

Extreme genetics divergence in the endemic fish *Chirostoma humboldtianum*

(Valenciennes, 1835): implications for its conservation.

Divergencia genética extrema en el pez endémico *Chirostoma humboldtianum*

(Valenciennes, 1835): implicaciones para su conservación.

Short Title: Genetic divergence in *Chirostoma humboldtianum*

Título corto: Divergencia genética en *Chirostoma humboldtianum*

García-Martínez R.M.<sup>1&2</sup>, O. Mejía<sup>3</sup>, F.J. García De León<sup>4</sup> e I.D.L.A. Barriga-Sosa<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División CBS, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340 México, Distrito Federal.

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola Departamento de Hidrobiología Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340 México, Distrito Federal.

<sup>3</sup>Laboratorio de Variación Biológica y Evolución Departamento de Zoología Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, C.P. 11340, Miguel Hidalgo, México DF.

<sup>4</sup>Laboratorio de Genética para la Conservación Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS 23090, México.

\*Corresponding author: [ibs@xanum.uam.mx](mailto:ibs@xanum.uam.mx)

## Abstract

*Chiostoma humboldtianum*, is an endemic species widely distributed in isolated basins of Central México. However, habitat alteration had reduced the range of distribution and led to the local extinction of the species in some basins. During the Miocene these basins were connected, allowing dispersal and colonization of new hydrological systems. Later on, tectonic, volcanic and climatic events of the Plio-Pleistocene promoted continuous periods of isolation and reconnection allowing the species evolve through continuous cycles of expansion and contraction of its distribution. Therefore it is expected that these events have left signals in the geographical distribution and genetic diversity and divergence of existing populations. Although the analysis of genetic diversity and genetic structure in the population becomes an important factor for the conservation of a species, few studies have been made in this taxon. In this study we used a 341pb segment of the domain I of the hypervariable region of the mitochondrial control region to analyze the genetic diversity and their distribution in 20 individuals of each one of six lakes located in central México. The values of haplotypic (0 - 0.938) and nucleotide (0 - 0.0352) diversity suggested continuous periods of expansion and contraction population related with the formation of the lakes during the Pleistocene which is supported by the BSP and mismatch analysis, and recent anthropogenic factors. In addition, the large number of exclusive haplotypes (66%) and the highly significant genetic differentiation among populations suggests that each one of the population must be conserved because each one is an important component in the evolutionary legacy of the species.

**Key words:** *Chiostoma humboldtinaum*, control region, genetic diversity, population genetics.

## Resumen

*Chiostoma humboltianum*, es una especie endémica ampliamente distribuida en cuencas aisladas del Centro de México. Sin embargo, la alteración del hábitat ha reducido drásticamente el área de distribución y llevado a la extinción local de la especie en algunas cuencas. Durante el Mioceno estas cuencas estuvieron conectadas, permitiendo la colonización y dispersión en nuevos sistemas hidrológicos.

Posteriormente, los eventos tectónicos, volcánicos y climáticos del Plio-Pleistoceno promovieron continuos periodos de aislamiento y reconexión, permitiendo que la especie evolucionara a través de ciclos de expansión y contracción de su distribución.

Por lo tanto, se espera que estos eventos hayan dejado huella en la distribución geográfica y diversidad genética de las poblaciones existentes. Si bien, el análisis de la diversidad genética en una población llega a ser un factor importante para la conservación de una especie, pocos estudios han sido realizados en este taxón. En este trabajo usamos un segmento de 341pb del dominio I hipervariable de la región control mitocondrial para analizar la diversidad genética y su distribución para 20 individuos de cada uno de los seis lagos localizados en la región central de México. Los valores de diversidad haplotípica (0-0.938) y nucleotídica (0-0.0352) sugieren continuos periodos de expansión y contracción poblacional relacionado con la formación de los lagos en el Pleistoceno lo cual es soportado por los análisis BSP y mismatch; y de factores antropogénicos recientes. En adición, la gran cantidad de haplotipos exclusivos (66%) y la alta diferenciación genética significativa entre las poblaciones sugiere que cada una de las poblaciones debe de ser conservada porque cada una es un componente importante en el legado evolutivo de la especie.

*Key words:* *Chirostoma humboldtinaum*, region control, diversidad genética, genetic poblacional

## INTRODUCTION

The genus *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae) (Saeed *et al.*, 1994; Dyer & Chernoff, 1996) is a group of endemic fishes inhabiting lotic and lentic systems in Central México (Barbour, 1973a; Miller *et al.*, 2005). Although the taxonomic status of the group has not fully resolved, Barbour (1973b) considers that there are 18 species and 6 subspecies. *C. humboldtinaum* is one of the species with the widest geographic distribution. This species is found in geographically isolated lakes and ponds of both clear and turbid water from the valley of Mexico to the Pacific Ocean following the Lerma - Santiago basin system (Miller *et al.*, 2005). Although currently the distribution of the species occurs in isolated basins, lacustrine deposits of the Miocene suggested that the Mesa Central of México was once drained by the vast Lerma - Santiago system (Miller & Smith, 1986) that in turn was connected with other reservoirs that had greater extensions (Barbour, 1973a; Israde-Alcántara, 1997; Moncayo-Estrada *et al.*, 2001). Therefore, it has been pointed that these connections allowed *C. humboldtinaum* populations to disperse and colonize new hydrological systems from the east to the west. The formation of the Mesa Central in the Pliocene, coupled with process of tectonic led to the compartmentalization of the basins, which were intensified by the formation of the Transvolcanic Belt that in turn promoted vicariant events in various aquatic organisms (Webb, 2004; Mulcay & Mendelson, 2000) and a strong divergence from intraspecific to the interspecific level (Echelle & Echelle, 1984; Barbour, 1973a). Likewise, geological activity, coupled with severe climatic oscillations promoted

continuous periods of isolation and reconnections that generated a complex hydrologic system (Moncayo-Estrada *et al.*, 2001; Israde-Alcantara, 1997). The above mentioned events of fragmentation and colonization are expected to leave signatures in the geographical distribution and in the genetic diversity of extant populations. Genetic diversity and geographical distribution often reflects process that occurred during historical time, as well as processes and environmental changes over contemporary time related mainly with the anthropogenic activities (Avice, 2000; Bernatchez & Wilson, 1998; Hewitt, 1996).

In *C. humboldtianum*, some factors related to the human activity such as habitat loss, pollution and overfishing (Alvarez & Navarro, 1957), as well as introduction of non-native fishes (Barbour, 1973a) have recently played important roles in the decline or even disappearance (local extinction) populations. In spite of this situation document over almost six decades, the species has not been appointed as threatened in the Official Mexican Standard Norms (NOM-059-Ecol-2001) nor in the IUCN Red List.

The aim in this study is to evaluate genetic diversity and differentiation of *C. humboldtianum* populations and to elucidate how historical and current factors have influenced its distribution, in order to develop a rational management and conservation program for the species due that the level of genetic diversity reflects the evolutionary potential of a species, which in turn is necessary to enable populations to cope with future environmental changes (Frankham, 2005).

## **MATERIALS AND METHODS**

**Sampling sites and sequencing of DNA.** One hundred and twenty specimens of *C. humboldtianum* were collected from six locations in Central Mexico (see Figure 1 & Table 1) and stored in 98% alcohol for mtDNA analysis.

**Please Insert Figure 1 & Table 1.....**

Twenty individuals per locality were used for DNA extraction from ethanol preserved muscle using the salt extraction protocol of Aljanabi & Martinez (1997). A fragment of 360 bp of the hypervariable section I of the mtDNA control region was amplified by PCR using the primers described by Pérez-Ramírez (2005), DloopF (Forward) 5'-GCT CTA ACT CCC AGG AAA ATT-3' and DloopR1 (Reverse) 5'-CAC CCC GAT TGC AAC TGT CC-3'. PCR reactions were carried out in a final volume of 25 µl and using a Biorad MyCycler Thermal Cycler (USA). PCR reactions contained 50-100 ng DNA, 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM dNTP mixture, 10 nmol of "forward" and "reverse" primers and 1U of enzyme Promega GoTaq PCR. The PCR program used includes an initial denaturation step at 96°C for 2 min, followed by 30 cycles of 96°C for 45s, 59°C for 30s, and 72°C for 45s, with a final extension at 72°C for 5min. The PCR products were visualized in agarose gels stained with ethidium bromide. Amplified products were purified using Wizard SV Genomic DNA Purification System Promega kit. The purified PCR products were sequenced in both directions using the PCR primers "forward" and "reverse" in a 10 µl reaction containing 2 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 2µl 2X buffer, 1µl of each primer (10µM), 3µl DNA template (containing approximately 50 ng of DNA) and 2µl of ddH<sub>2</sub>O water. The thermocycler amplification conditions were: 35 cycles at 96 °C for 30 s, 59.2 °C for 15 s and 60 °C for 4 min. Sequencing reactions were resolved in the automatic sequencer ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems) at Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa.

**Genetic diversity and population structure.** Compiled DNA sequences were edited in BioEdit (Hall, 1999), aligned with Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) and checked by eye.

Genetic diversity within lakes was determined by assessing the number of haplotypes, polymorphic sites, haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ), using DnaSP ver. 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

Population structure was determined using BAPS (Corander *et al.*, 2003; 2004). The Bayesian method implemented in the BAPS software was run under spatial model with the maximal number of groups (K) set from 1 to 20. Each run was replicated six times, and the results were averaged according to the resultant likelihood scores. Additionally the spatial distribution of genetic variation was examined using a hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) with significance levels set at  $\alpha = 0.05$  and 10,000 random permutations as implemented in Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Total genetic variation was partitioned according to the number of clusters defined in BAPS software. On the other hand, genetic differentiation between pairs of population were evaluated *a posteriori* by means of the pairwise  $F_{ST}$  (Excoffier *et al.*, 1992). The significance of the  $F_{ST}$  value was evaluated by performing a randomization test with 10000 replications with a level of significance of  $\alpha = 0.05$ . The diversity indices and  $F_{ST}$  values were calculated using the Tamura-Nei (1993) model with gamma shape distribution parameter of 0.473, which was determined by Modeltest (Posada & Crandall, 1998) as the best evolutionary model for our sequences.

**Relationships among populations.** The genetic relationships among the resolved haplotypes were reconstructed using the neighbor-joining (NJ) method (Saitou & Nei, 1987) implemented in PAUP (Swofford, 1998). Genetic distances were generated for phylogenetic reconstructions using resolved models of substitution suggested by Modeltest (Posada & Crandall, 1998). The best fit for the control region data was TRN

model (Tamura & Nei, 1993) with variable sites and gamma shape parameters (TRN + I +  $\Gamma$ , R = 0.642,  $\Gamma$  = 0.473, with bases frequencies: A: 0.3582, C: 0.1983, G: 0.1630, T: 0.2806). A bootstrap analysis with 1000 replicates was used to evaluate the support for genetics relationships (Felsenstein, 1985).

In addition, genealogical relationships were examined by means of haplotype networks using the median joining algorithm implemented in Network software (Bandelt *et al.*, 1999).

**Demographic patterns.** Considering that both historical and contemporary process of basin had contributed to the genetic composition of the species, we tested for possible changes in demographic patterns using several approaches. First, in order to quantify the significant departure from mutation-drift equilibrium, we evaluated the neutrality estimators Tajima's  $D$  (Tajima, 1989) and Fu's  $F_s$  (Fu, 1997) in Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Likewise, we performed a mismatch distribution analysis (MMD) of pairwise substitution differences among haplotypes to investigate the demographic history of population by comparing the observed distribution with that expected under the assumption of an expansion model. A unimodal mismatch distribution indicates a recent range expansion; multimodal, including bimodal, mismatch distribution indicates diminishing population size or structured, in contrast a population that has been stationary for a long time become ragged and erratic (Excoffier and Schneider, 1999; Roger and Harpending, 1992; Excoffier *et al.*, 1992), however, the multimodal distributions may also indicate that the population is influenced by migration, is subdivided and/or has undergone a greater number of recent coalescent events (historical contractions) (Ray, *et al.* 2003; Marjoram & Donnelly, 1994). The smoothness of the observed distribution was quantified by the sum-of-squared deviations and



Harpending's raggedness index  $R$  (Harpending, 1994) as implemented in Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

Secondly, we estimated the demographic expansion parameters  $\tau$  (MMD age expansion parameter),  $\theta_0$  (pre-expansion population size),  $\theta_1$  (post-expansion population size), using the generalized non-linear least-square approach. The absolute time of population expansion ( $t$ ) was calculated through the relationship  $t = \tau/2u$ , where  $\tau$  measures the time in unit of  $\frac{1}{2} \mu$  generations,  $\mu$  is the mutation rate per sequence under study per generation) and  $u$  represents the mutation rate per sequence under study per year (Rogers & Harpending, 1992). We used a time of generation of 1 year and a mutation rate of 3.5% as estimated for the same region in the silverfish *Pleuragramma antarcticum* (Zane *et al.*, 2006).

As a final step, the demographic history was reconstructed using the Bayesian skyline plot method to detected changes in the effective population size through time using Beast 1.5.1 (Drummond *et al.*, 2005). Four independent Markov chains assuming a strict molecular clock and a coalescent Bayesian skyline model were run for 30 million generations with sampling performed every 10,000 steps. The results of the four independent chains were combined in LogCombiner 1.5.4. (Drummond & Rambaut, 2007) and the Bayesian skyline plots for each population were generated in Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009).

## RESULTS

**Genetic diversity and population structure.** We sequenced and analyzed 341 pb for the control region (CR) in 120 specimens, and recovered 57 polymorphic sites (42 parsimony informative) and 55 haplotypes (Accession KF651987 to KF652041), with almost 66% of unique haplotypes. No insertions or deletions were detected. Overall

haplotype diversity was  $h = 0.938$  and nucleotide diversity  $\pi = 0.0352$  (Table 1). Most haplotypes were defined by substitutions at a single site. Only two haplotypes were shared among individuals from different localities. One of them was also the most common haplotype, found in 27 individuals from the sites Tiacaque (20), Villa Victoria dam (1), Tepuxtepec dam (3), Zacapu lake (1) and San Juanico lake (2), and the other haplotype was found in two individuals from San Juanico lake and San Pedro Lagunillas lake. Seventeen of the haplotypes were shared among individuals within the same localities. The remaining 36 haplotypes (66%) were presented only in single individuals. Haplotype diversity values ( $h$ ) were high, ranging from 0.789 to 0.979 (Table 1). The exception was the Tiacaque population for which only one haplotype was resolved. Nucleotide diversity ( $\pi$ ) analyzed per population showed values ranging from 0.0000 to 0.0384, with the highest value observed in San Juanico (0.0384) and the lowest in Tiacaque (0.00) (Table 1).

BAPS resolved five genetic clusters, with log marginal likelihoods of -1408.6458. The analysis showed a mixture of individuals from different geographic locations in the same clusters. Group A is the most heterogeneity and it is constituted by individuals from Tiacaque dam (20 individuals), Zacapu Lake (20), Tepuxtepec dam (3), San Juanico Lake (5), San Pedro Lagunillas Lake (2) and Villa Victoria dam (1). Group B is conformed by individuals from Villa Victoria dam (19), San Juanico Lake (5) and Tepuxtepec dam (1). Group C include individuals from Tepuxtepec dam (16), San Juanico Lake (5) and San Pedro Lagunillas Lake (1). Group D is formed of individuals from San Pedro Lagunillas Lake (17) and group E was constituted with the specimens from San Juanico Lake (5).

An Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed that 70.30% of the total variation corresponds to variation unshared among BAPS defined groups, 10.15% is variation unshared among population within a group and 19.55% is variation distributed within populations. The fixation indices shown significant differences in the three levels after 10000 randomizations ( $F_{CT} = 0.030$ ,  $P < 0.001$ ;  $F_{SC} = 0.3418$ ,  $P < 0.001$ ;  $F_{ST} = 0.8045$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 2).

***Please Insert Table 2.....***

The  $F_{ST}$  paired values were high and significant, and ranged from 0.1712 for San Juanico lake – Tepuxtepec dam up to 0.8288 for Villa Victoria dam – Tiacaque (Table 3).

***Please Insert Table 3.....***

**Relationships among populations.** The generated NJ of the 55 resolved haplotypes allowed the identification of the same five groups recovered by BAPS, and analyzed in AMOVA, with bootstrap support higher than 60 % (Figure 2).

***Please Insert Figure 2.....***

The median joining network exhibits a pattern consistent with a complex demographic history and little geographic structure (Figure 3). Haplotype A01 is widely distributed, occurring at high frequency in Tiacaque dam and also being present in four of the five basins (Villa Victoria dam, Tepuxtepec dam, San Juanico and Zacapu lakes). Haplotype A10 was shared between two individuals from different localities (San Juanico and San Pedro Lagunillas), 17 of the 55 haplotypes were shared by individuals of the same location and the remaining 36 haplotypes were found each at a single individual. The five groups recovered in the Bayesian analysis and NJ was also resolved in the haplotypes network.

Haplogroups A and B are separated by seven mutational steps, and those groups are separated from C, D and E by nine nucleotide substitutions (Figure 3). Groups C and D are separated each one only by four mutational steps, while group C and E are separated by ten nucleotide substitution. Haplotypes within groups were mostly separated by one or two nucleotide substitutions; however, groups C and D, shows some haplotypes separated by six substitutions.

***Please Insertar Figure 3.....***

**Demographic patterns.** The histograms of the mismatch distribution (MMD) of the entire population showed a bimodal distribution that deviated from the expected distribution under the sudden expansion model (Figure 4). This outcome is supported by lack of significance of the Tajima's *D* and Fu's *F<sub>s</sub>* tests. On the other hand, the MMD in Group A showed L-shaped distribution, which represent a balanced distribution. Groups B, C and D showed an unimodal distribution that suggests an expansion process (Figure 4). The MMD for group E was not performed because this group is only comprised by five individuals and demographic analyzes lose their validity under a very low sample size. In all cases, raggedness indices (*r*) were not significant, thus not allowing us to reject the null hypothesis of stationarity (Table 4). The examined populations displayed negative non-significant Tajima's *D* values. Similarly, the calculated Fu's *F<sub>s</sub>* values were negative, and only group D showed a significant value with a time since expansion of 225,178 years ago ( $\tau = 2.6875$ ) (Table 4). We estimated that during the expansion, the population increased from  $\theta_0$  (1.4641) to  $\theta_1$  (225). The Bayesian Skyline Plot analysis for group D also indicates a population expansion during the last 300,000 years. Group A, B show a stable trend in population size in the last 200,000 years, and C resolved also as

stable since the last 250,000 years (Figure 5). There is not graph for group E for the reasons previously mentioned.

**Please Insert Figure 4.....**

**Please Insert Figure 5.....**

## DISCUSSION

Ward *et al.* (1994) suggested that freshwater fish in general terms exhibit lower levels of genetic diversity in comparison to marine fish using allozyme markers. Other works using allozymes markers had shown low genetic diversity levels for this and other species of the genus *Chiostoma*, although such results might be related to the low polymorphism exhibited by those markers (Barriga-Sosa *et al.* 2004) and to the limited number of specimens analyzed (6-8 individuals) (Barriga-Sosa *et al.* 2002). In contrast to the result reported by Ward *et al.* (1994), we recovered a relatively high number of haplotypes (55) with a mitochondrial marker in 120 analyzed specimens, with almost 66% of unique haplotypes, and high average values of both haplotype and nucleotide diversity ( $h = 0.938$  and  $\pi = 0.035$ ). For other species of freshwater fishes, lower values of genetic diversity have been reported using the same mitochondrial region. For instance, in fish living in cenotes, Vázquez-Domínguez *et al.* (2009) resolved 5 haplotypes in 56 individual and average haplotype and nucleotide diversity of 0.15 and 0.001 respectively; in the atherinomorphs, *Atherinomorus endrachtensis*, Gotoh *et al.* (2011) found 72 haplotypes in 205 individuals,  $h = 0.151-0.593$  and  $\pi = 0.00026 - 0.0029$ , whereas for the close relative *Odontestes argentinensis*, Beherengaray & Sunnuck (2001) reported what they considered high values of  $h = 0.85 - 0.94$  and  $\pi = 0.014 - 0.018$ .

The analysis of genetic diversity in the examined population of *C. humboldtianum* exhibited greatly variable values. Grant and Bowen (1998) have proposed that high values of nucleotide diversity ( $\pi$ ) and haplotype diversity ( $h$ ) found in San Juanico lake, Tepuxtepec dam, Villa Victoria dam and San Pedro Lagunillas lake and Zacapu lake (Table 1), are characteristic of a stable population with long evolutionary history or population admixture of differentiated lineages. However, the genealogical analysis does not support a long evolutionary history for the species, as can be observed by the absence of deep branching among haplotypes (Figure 2). This result indicates that *C. humboldtianum* is a recent species (Moncayo-Estrada *et al.*, 2001, Echelle & Echelle, 1984) that diversified ca. 0.52 mya (Bloom *et al.*, 2013). Furthermore, we believe that the admixture hypothesis is more likely for the species, since each geographic population consists of a mixture of haplotypes that do not show geographic pattern (Figure 1).

The complex geological history of the Mesa Central in the Plio-Pleistocene caused several periods of isolation and reconnection among basins (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2005; Moncayo-Estrada *et al.*, 2001; Israde-Alcántara & Garduño-Monroy, 1999; Barbour, 1973a; Tamayo & West, 1964). In first instance, the separation of basins produced geographic isolation. This separation is well documented for the late Pleistocene and early Holocene (Alvarez & Moncayo, 1976; Barbour, 1973a). This geographic isolation is reflected in the high and significant genetic differentiation found among basins/groups in this study. On the other hand, the periods of reconnection favored gene flow among previously isolated populations. Additionally, climatic oscillations related to Pleistocene glaciations caused many cycles of contraction of geographic ranges during cold periods and expansion during subsequent warming (Bradbury, 2000; Israde-Alcántara & Garduño-Monroy, 1999; Ferrari *et al.*, 1999). In this

sense, both analyses, the mismatch distribution and Bayesian Skyline plot support the hypothesis of a rapid population growth of *C. humboldtianum* during this period. Likewise, the global MMD suggest connections and gene flow among the basins in the past or multiple events of population expansion.

The hypothesis of sudden expansion of group D is also supported by the negative  $F_s$  values and the star-shaped haplotype network (Figure 3). This type of network is characteristic in populations that have experienced a recent population expansion from a smaller number of founders (Avice, 2000). The Bayesian skyline plot showed that the group D experienced an expansion process 200,000 ~ 300,000 years ago (Figure 5); furthermore the expansion was estimated to be ~ 225,178 years ago from the sudden expansion model ( $\tau = 2.26875$ ) (Table 4). This estimation suggests that the expansion occurred in the middle Pleistocene (between 126,000 and 781,000) when volcanic and tectonic activity were more intense in the Mesa Central causing the overflow of the Chapala basin towards the ancestral Río Grande de Santiago and conducting to the isolation of Río Lerma and the formation of modern Ameca and Lerma-Santiago rivers (Miller *et al.*, 2005, Barbour, 1973a).

Our results of MMD suggest that the expansion time of the group C and group B was during middle Pleistocene (594,855 and 458,215 years ago, respectively) ( $\tau = 2.6875$ ) (Table 4). Previous studies and historical inferences based on the fish fauna of this region have reported a series of paleolakes that joined the Valle de México and Río Lerma (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2008; Moncayo-Estrada *et al.* 2001; Israde-Alcántara & Garduño-Monroy, 1999; Barbour, 1973a; Tamayo & West, 1964). However, during the Plio–Pleistocene these connections were broken by tectonic and volcanic activity (Doadrio & Domínguez, 2004; Israde-Alcántara & Garduño-Monroy, 1999).

During late Pleistocene to early Holocene a successive reconnection between the Valle de México and Río Lerma led to a new contact between species and to a genetic exchange through NE-SW and E-W faulting, which cuts the Sierra de las Cruces (Israde- Alcantara & Garduño-Monroy, 1999; Barbour, 1973a). The above mentioned is supported by the fossil record of fishes of the Valle de México, which currently are not distributed in this basin (Álvarez & Moncayo, 1976).

The complex recent geological processes of Central México region were decisive in shaping the genetic structure of this species, however, complexity increased by human activity. For instance, it is documented that during the 70's translocations of species of "peces blancos" and minnows were conducted into several water reservoirs of México including Michoacán and Estado de México (Rosas, 1976). In this regard, Álvarez (1963) and Barbour (1973a) referred to *Chirostoma consosium consocium* and *C. c. reseratum* as native species of San Juanico lake, however, E. Soto-Galera (per.com. Laboratorio de Ictiología y Limnología) reports the current presence of *C. humboldtianum* in the basin. Furthermore and although the presence of the species in Zacapu Lake is referred by several authors as part of its original distribution (Paulo-Maya *et al.*, 2000; Barbour, 1973a; Álvarez, 1963), Medina Nava (1997) mentions its introduction in this basin, however, she did not mention possible year(s) of introduction. The species has also been reported in lakes Chapala, Pátzcuaro and Zirahuén (Barriga-Sosa *et al.*, 2002; Alaye, 1993; Alvarez & Navarro, 1957; Barbour, 1973b).

The present study allows concluding that the genetic structure of *C. humboldtianum* can relate to geological and climatic events of the Plio-Pleistoceno, although we cannot discard that translocations could explain the presence of the shared haplotypes in different geographical location. Thus, our results prompts for futher genetic



population studies designed to determine the level of integrity and/or genetic introgression of the species and closely related species along its range of distribution.

**Conservation implications.** México has 375 freshwater fish species, 60% native (Miller, 1986). Anthropogenic factors such as habitats destruction, introduction of exotic species, pollution and eutrophication threaten wildlife inhabiting freshwater reservoirs (Miller *et al.* 2005).

A study performed by Soto-Galera *et al.* (1998) in 116 sites of the Río Lerma basin showed that of 44 native species recorded in the period 1885-1975, three were extinct, and 23 species had a large reduction in rank or health. In contrast, the same author found that in the period 1985-1993 more than half of the study sites disappeared or were so polluted that they could no longer support fish fauna. In addition, although *C. humboldtianum* had been designated as stable specie, it has been extirpated from some basins (Lyons *et al.* 1998).

The results of the present study might contribute to the development of conservation strategy plans for *C. humboldtianum*, as has been previously proposed by Barriga-Sosa *et al.* (2002), whom reported a strong genetic population differentiation in the species as it is also resolved in the present study (see pairwise  $F_{ST}$  values)

Although we are aware of the possible evolutionary stochastic effects and of the limitation of defining conservation units only on mtDNA result, we propose that five of the six analyzed populations could be proposed to candidates to be preserved under legal protection, since all of them contain a portion of the total variation of the species. Each of these geographic locations can be tentatively defined as an ESU (Evolutionary Significance Unit), as that each one is a segment of the population or group of stocks that are reproductive isolated from other con-specific, or unrelated population and

represent an important component of the evolutionary legacy of the species (Waples, 1995). However, further studies using other molecular markers as microsatellites or SNPs, can aid in corroborating this proposal.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study is part of the PhD thesis of the first author at Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud at Universidad Autónoma Metropolitana– Iztapalapa. Fellowship CONACYT-224707 was granted to Rosa María García Martínez. Financial support was received from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-CB-2009-01-130220) and UAM.147.07.03/147.09.0. Mexican government kindly issued permit number DGOPA.07343.310810.4128 to conduct this research. We thank the Biologist Ramón Cisneros and the fishermen of each collection site for their support in the capture of organism. We also thank Dr. Joel Paulo Maya for their help in specimen identification.

### **REFERENCES**

- Alaye, R. N. 1993. Hematología de Aterínidos de aguas dulces: Género *Chirostoma* spp. del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. *Ciencia Pesquera* 10: 97-109.
- Aljanabi, S.M. & I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt–extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25 (22): 4692–4693.
- Álvarez, J. 1963. Ictiología Michoacana III. Los peces de San Juanico y de Tocumbo, Michoacán. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 12 (1-4): 111-138.
- Álvarez, J. & M. E. Moncayo. 1976. Contribución a la paleoictiología de la Cuenca de México. *Anales del Instituto Nacional de Antropología e Historia* 6: 191-242.

- Alvarez, J & L. Navarro. 1957. *Los peces del valle de México*. Secretaría de Marina, Instituto Nacional de Pesca, Dirección de Pesca e Industrias Conexas, México, D.F. 62p.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447 pp.
- Avise, J. C., J. E. Neigel & J. Arnold. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal Molecular and Evolution* 20: 99-723.
- Bandelt, H. J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median – joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.
- Barbour, C.D. 1973a. A Biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A Species Flock from the Mexican Plateau. *Copeia* 1973 (3): 533-556.
- Barbour, C.D. 1973b. The systematic and evolution of the genus *Chirostoma* Swainson (Pisces: Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany* 18 (3): 97-141.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., A. L. Ibáñez-Aguirre & J. L. Arredondo Figueroa. 2002. Morphological and genetic variation in seven species of the endangered *Chirostoma "humboldtianum" species group* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Revista de Biología Tropical* 50 (1): 199-216.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., L. E. Eguiarte & J. L. Arredondo Figueroa. 2004. Low but Significant subdivision among Populations of *Chirostoma grandocule* from Lake Patzcuaro, México. *Biotropica* 36 (1): 85-98.

Beheregaray L. B. & P. Sunnucks. 2001. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish. *Molecular Ecology* 10: 2849 – 2866.

Bernatchez, L. & C. C. Wilson. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7: 431- 452.

Bloom, D. D., J. T. Weir, K. R. Piller & N. R. Lovejoy. 2013. Do freshwater fishes diversify faster than marine fishes? A test using state-dependent diversification analysis and molecular phylogenetics of New World silversides (Atherinopsidae). *Evolution* 67(7): 2040 – 2057.

Bradbury, J.P. 2000. Limnologic history of Lago de Patzcuaro, Michoacan, Mexico for the past 48000 years: Impacts of climate and man. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 163(1–2): 69-95.

Corander J., P. Waldmann, P. Marttinen & M.J. Sillanpaa. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20: 2363–2369.

Corander J, P. Waldmann & M.J. Sillanpaa. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367–374

Doadrio, I. & O. Domínguez. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 (2): 416-430.

Domínguez–Domínguez, O., F. Alda, G. Pérez–Ponce de León, J.L. García–Garitagoitia & I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* Bean, 1898 (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach

to phylogeography base on mitochondrial and nuclear DNA data. *BMC Evolutionary Biology* 8: 161.

Drummond, A. J. & A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214 doi: 10.1186/1471-2148-7-214.

Drummond, A. J., A. Rambaut, A. Shapiro & O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5): 1185-1192.

Dyer, B.S. & B. Chernoff. 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Zoological Journal Linnean Society, London* 117: 1-69.

Echelle, A. A. & A. F. Echelle. 1984. Evolutionary genetics of a species flock: Aterinid fishes on the Mesa Central of México. In *Evolution of fish species flocks* edited by: Echelle A. A. & I. Kornfield. Orono, University of Maine; 93-110.

Excoffier, L. & H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. [\*Molecular Ecology Resources\* 10 \(3\): 564-567.](#)

Excoffier, L. & S. Schneider. 1999. Why hunter-gatherer populations do not show sign of Pleistocene demographic expansions. *Proceeding of the Naturalist Academy of Sciences. USA* 96 (10): 10597-10602.

Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quatro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131 (2): 479-491.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.

- Ferrari, L., M. López-Martínez, G. Aguirre-Díaz & G. Carrasco-Núñez. 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central México: from the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27 (4): 303-306.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation* 126: 131-140.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147 (2):915-925.
- Gotoh, R. O., S. N. Chiba, T. V. Goto, H. B. Tamate & N. Hanzawa. Population genetic structure of the striped silverside, *Atherinomorus endrachtensis* (Atherinidae, Atheriniformes, Teleostei), inhabiting marine lakes and adjacent lagoon in Palau: marine lakes are "Islands" for marine species. *Genes and Genetic Systems* 86: 325-337.
- Grant, B. R. & B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons of conservation. *The Journal of Heredity* 89 (5):415-426.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66 (4):591-600.
- Hewitt, G. 1996. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Israde-Alcántara, I. & V. H. Gaduño-Monroy. 1999. Lacustrine record in a volcanic intra-arc setting: the evolution of late Neogene Cuitzeo basin system (central-western México, Michoacán). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 151: 209-227.

- Israde-Alcántara, I. 1997. Neogene diatoms of cuitzeo lake central sector of the Trans-Mexican Volcanic Belt and their relationship with the volcano-tectonic evolution. *Quaternary International* 43/44: 137-143.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSp ver. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11): 1451-1452.
- Lyons J., G. González-Hernández, E. Soto-Galera & M. Guzmán-Arroyo. 1998. Decline of Freshwater fishes and fisheries in selected drainages of west-central Mexico. *Fisheries Managements* 23(4): 10-18.
- Marjoram, P. & P. Donnelly. 1994. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics* 136 (2): 673 – 683.
- Medina Nava, M. 1997. Ictiofauna de la subcuenca del Río Angulo cuenca del Lerma-Chapala, Michoacán. *Zoología Informa* 35: 25-52.
- Miller, R. R., W. L. Minckley & S. M. Norris. 2005. *Freshwater Fishes of México*. The University of Chicago Press. Chicago. 490 p.
- Miller, R. R. 1986. Composition and derivation of the freshwater fish fauna of México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 30: 121-155.
- Miller, R. R. & M. L. Smith. 1986. Origin and geography of the fishes of Central México. *In: C.H. Hocutt & E.O. Wiley (Eds.). Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley & Sons, New York, pp. 487-517.
- Moncayo-Estrada, R., I. Israde-Alcántara & V. H. Garduño-Monroy. 2001. La cherehuita *Hubbsina Turneri* De Buen (1941) (Pisces: Goodeidae). Origen, distribución y uso de la regionalización de la cuenca del Lerma. *Hidrobiológica* 11(1): 1-18.

Mulcahy, D. G. & J. R. Mendelson. 2000. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17 (2): 173-189.

Official Mexican Standar NOM-059-Semarnat-2001. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, México. Diciembre. 77pp.

Paulo-Maya, J., G. Figueroa Lucero & M. Soria-Barreto. 2000. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX. *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zoología Informa* 43: 59-74.

Pérez-Ramírez, M.Y. 2005. Discriminación morfológica, molecular y determinación de la variación genética de peces blancos (Pisces: Atherinopsidae). Tesis de Maestría en Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa, México. 88 pp.

Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Rambaut, A. & A. J. Drummond. 2009. Tracer v1.5. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

Ray, N., M. Currat & L. Excoffier. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20(1): 76 – 86.

Rogers, A. & H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9 (3): 552-559.

Rosas, M.M. 1976. Datos biológicos de la Ictiofauna del Lago de Pátzcuaro con especial énfasis en la alimentación de sus especies. *Memorias del simposio sobre pesquerías en aguas continentales*. Tuxtla Gutiérrez, Chis. Tomo II. *Instituto Nacional de Pesca*. México, pp. 299-366.



Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-25.

Saeed, B., W. Ivantsoff & L. E. L. M. Crowley. 1994. Systematic relationships of atheriniform families within Division I of the Series Atherinomorpha (Acanthopterygii) with relevant historical perspectives. *Journal of Ichthyology* 34 (9): 27-72.

Soto-Galera, E., E. Díaz-Pardo, E. López-López & J. Lyons. 1998. Fish as indicators of environmental quality in the Río Lerma Basin, México. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 1: 267-276.

Swofford, D. L. 1998. *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Ver. 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamayo, J. L. & R. C. West. 1964. Surface Configuration and Associated Geology of Middle America. In: Wauchope R. & R.C. West (Eds.). *Handbook of Middle American Indians*. Univ. Texas Press, Austin, pp. 84-121.

Tamura, K. & M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10 (3): 512-526.

Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (1): 253-262

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

Vázquez-Domínguez, E., A. Hernández-Valdés, A. Rojas-Santoyo & L. Sambrano. 2009. Contrasting genetic structure in two codistributed freshwater fishes species of highly seasonal systems. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 181-192.

- Waples, R. S. 1995. Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the endangered species act. *American Fisheries Society Symposium* 17: 8-27.
- Ward, R. D., M. Woodwark & D. O. F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal Fish Biology* 44: 213-232.
- Webb, S. A., J. A. Graves, C. Macias-Garcia, A. E. Magurran, D. Ó Foighil & M. G. Ritchie. 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular phylogenetics and Evolution* 30: 527-544.
- Zane, L., S. Marcato, L. Bargelloni, E. Bortolotto, C. Papetti, M. Simonato, V. Varotto & T. Patarnello. 2006. Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. *Molecular Ecology* 15 (14): 4499-4511.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Map showing collected localities from *Chiostoma humboldtianum* specimens. The graphs represents haplotypes groups (Group A = blue, Group B = red, Group C = green, Group D = purple and Group E = gray), the numbers on the graphs represents the individuals of each population by each group of haplotypes.

Figure 2. Unrooted NJ tree using the substitution model TRN with invariable sites and gamma distribution (TRN + I +  $\Gamma$ , R = 0.642,  $\Gamma$  = 0.473) for the 55 resolved haplotypes of *Chiostoma humboldtianum*. Bootstrap supports >60% and after 1000 replicates are shown in the upper part of the clades.

Figure 3. Haplotype median-network resolved for the 55 haplotypes of the CR and the previously resolved groups A, B, C, D & E. The sizes of the circles are proportional to the frequency of the haplotypes. Perpendicular bars to the vertical lines that connect the haplotypes represent the number of nucleotide substitutions between them.

Figure 4. Mismatch distribution for four groups of *C. humboldtianum* and total population. Grey bars indicate the observed values and black lines show the expected distribution under the sudden expansion model.

Figure 5. Bayesian Skyline Plot for four populations of *C. humboldtianum*, including the 95% highest probability density (HPD) interval.

Table 1. Summary of genetic diversity parameters in six lacustrine samples of *Chirostoma humboldtianum* based on mtDNA control region sequences. It shows the number of specimens (n), haplotype number (HN), nucleotide and haplotype diversities ( $\pi$ ,  $h$ ,  $\pm$ SD).

Collecting site	ID	Geographic coordinates	Collecting year	n	HN	$h$	$\pi$
Las Tazas dam, (Tiacaque), Edo. de México	T	19°38'29"N-99°42'27"O 2540 msnm	2002	20	1	0	0
Villa Victoria dam, Edo. de México	VV	19°26'N-100°00'O 2570 msnm	2009	20	9	0.789±0.086	0.0123±0.0029
Tepuxtepec dam, Michoacán	Tx	19°59'42"N-100°13'33"O 2361 msnm	2010	20	11	0.932±0.030	0.0261±0.0033
Zacapú lagoon, Michoacán	Z	19°49'26"N-101°46'45" 1980 msnm	2003	20	9	0.832±0.063	0.0098±0.0014
San Juanico lagoon, Cotija, Michoacán	SJ	19°51'16"N-102°40'34"O 1625 msnm	2010	20	13	0.958±0.025	0.0384±0.0020
San Pedro Lagunillas lagoon, Nayarit	SP	21°12'48"N-104°44'12"O 1248 msnm	2010	20	17	0.979±0.024	0.0186±0.0038
Total				120	60	0.938±0.016	0.0352±0.0011

Table 2. AMOVA results based on samples of *Chirostoma humboldtianum* from six localities. The significance values associated to the variance components were obtained after 10000 randomizations.

Source of variation	df	Sum squares	Variance	Variance %	P
			Components		
Among groups ( $F_{CT} = 0.7030$ )	4	502.142	5.2843	70.30	< 0.001
Among populations within groups ( $F_{SC} = 0.3418$ )	9	53.857	0.7631	10.15	< 0.001
Within populations ( $F_{ST} = 0.8045$ )	106	155.743	1.4693	19.55	<0.001
Total	119	711.742	7.5166		

Table 3. Pairwise  $F_{ST}$  values for the *Chirostoma humboldtianum* samples from six localities (below the diagonal) and its significance value (above the diagonal).

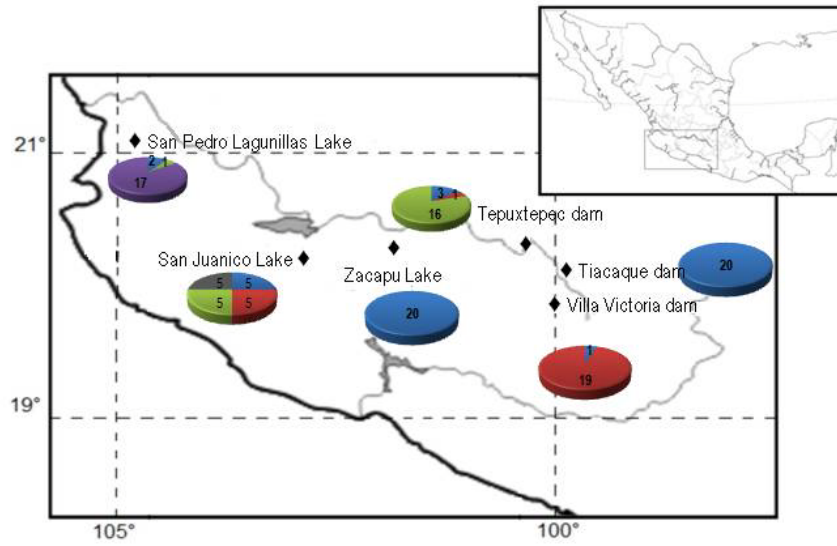
	T	VV	Tx	Z	SJ	SP
T	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VV	0.8288*	0	0.00	0.00	0.00	0.00
Tx	0.6512*	0.5572*	0	0.00	0.00	0.00
Z	0.5436*	0.6876*	0.5419*	0	0.00	0.00
SJ	0.5334*	0.3296*	0.1712*	0.4342*	0	0.00
SP	0.7684*	0.6698*	0.2901*	0.6740*	0.3421*	0

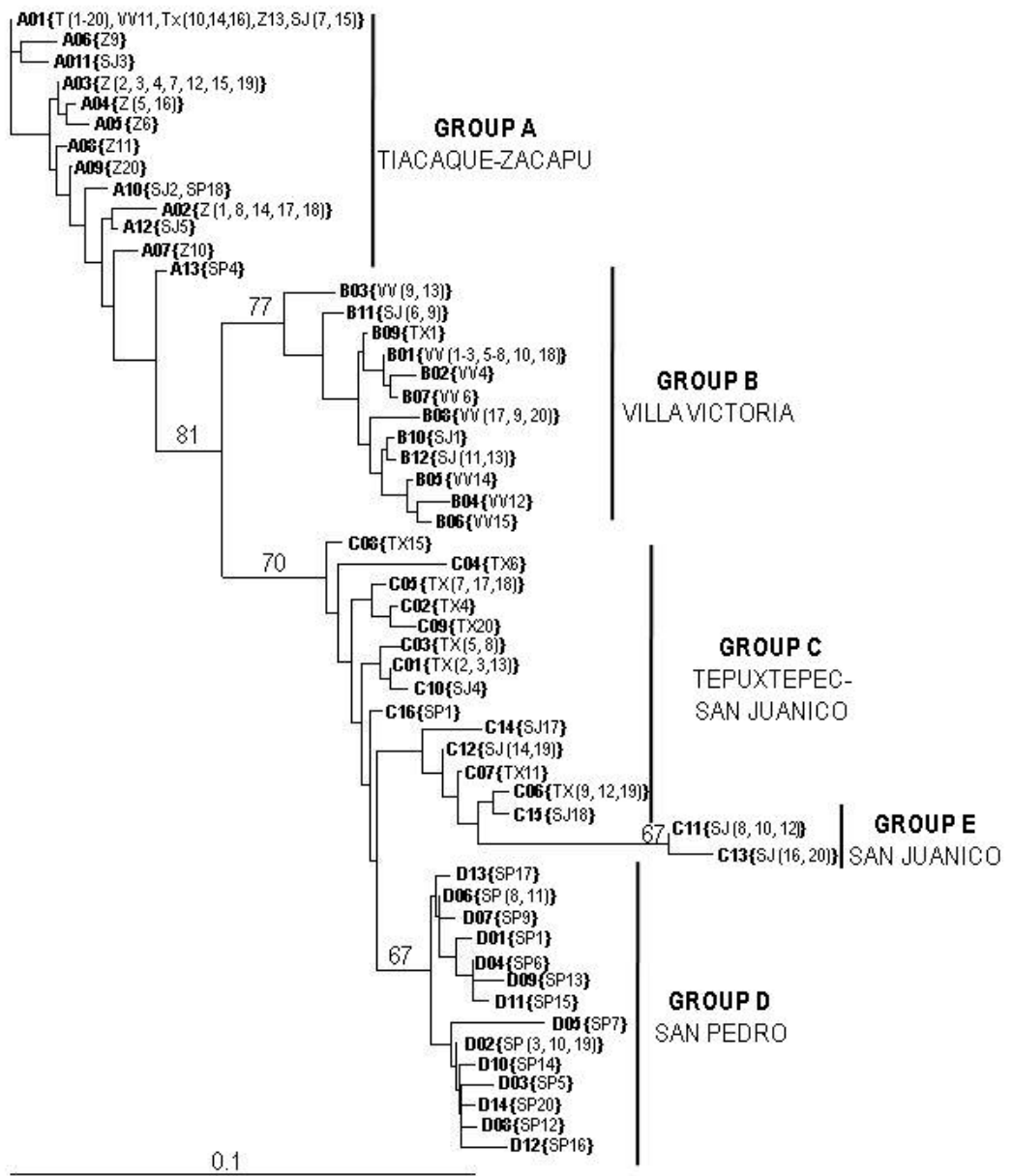
T = Tiacaque; VV = Villa Victoria dam; Tx = Tepuxtepec dam; Z = Zacapu lagoon; SJ = San Juanico lagoon; SP = San Pedro Lagunilla lagoon. \*P < 0.05 values

Table 4. Demographic parameter estimates and neutrality test within the six populations samples.

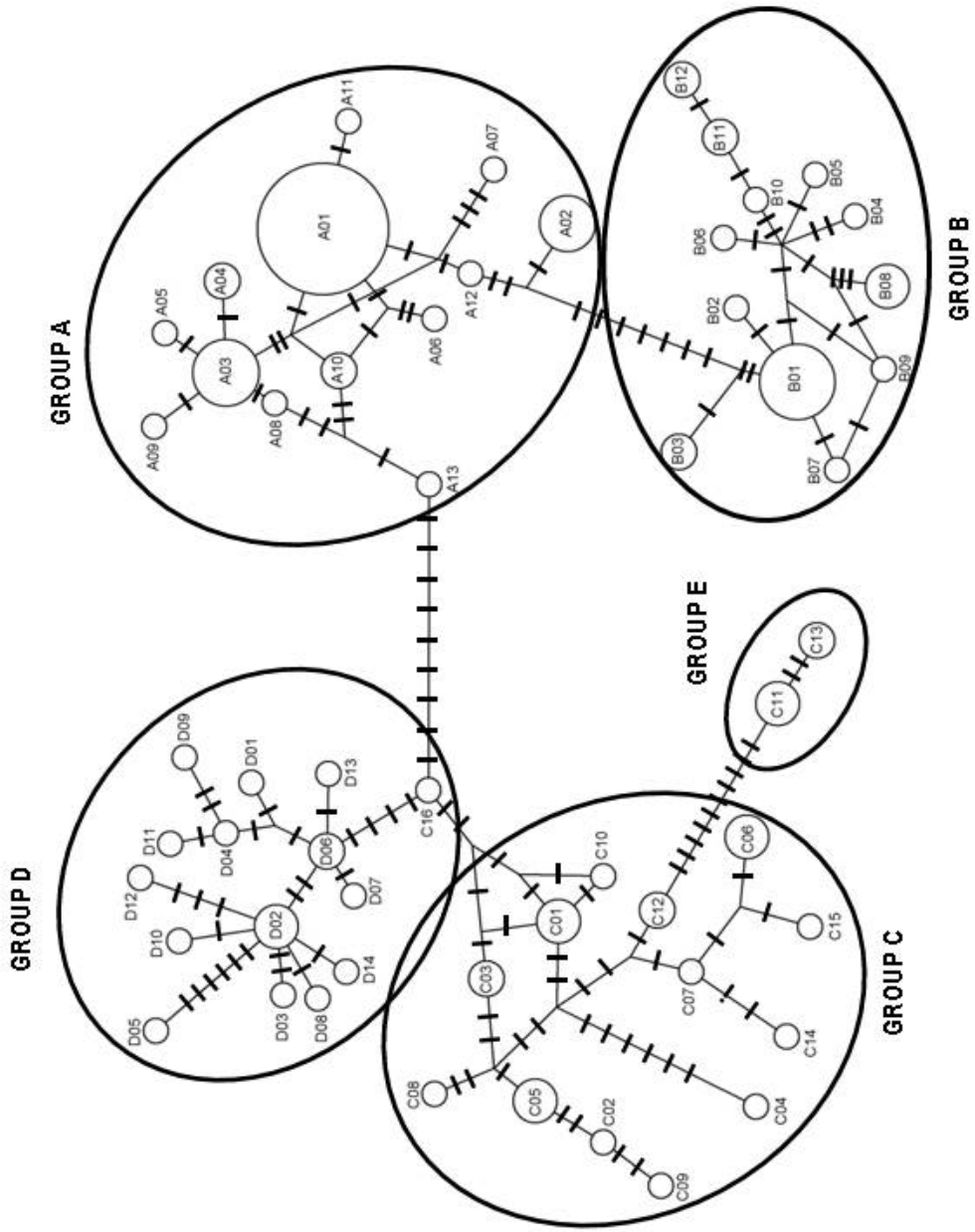
Populations	<i>Fu's F<sub>s</sub></i>	<i>Tajima's D</i>	Mismatch distribution				
	<i>F<sub>s</sub></i>	<i>D</i>	$\tau$	$\Theta_0$	$\Theta_1$	<i>SDD</i>	<i>Hri</i>
Group A	-3.1147 <sup>ns</sup>	-0.6758	4.7344	0	4.3066	0.0465 <sup>ns</sup>	0.1012 <sup>ns</sup>
Group B	-2.6818 <sup>ns</sup>	-0.4700 <sup>ns</sup>	5.4688	0.0018	11.1186	0.0255 <sup>ns</sup>	0.0615 <sup>ns</sup>
Group C	-3.3212 <sup>ns</sup>	-0.1819 <sup>ns</sup>	7.0996	0.088	34.4629	0.0051 <sup>ns</sup>	0.0203 <sup>ns</sup>
Group D	-8.2647 <sup>**</sup>	-1.2522 <sup>ns</sup>	2.6875	1.4641	225	0.0006 <sup>ns</sup>	0.0150 <sup>ns</sup>
Group E	1.6876 <sup>ns</sup>	1.4588 <sup>ns</sup>	2.4199	0	3.8189	0.2335 <sup>ns</sup>	0.8800 <sup>ns</sup>
Total	-3.1389 <sup>ns</sup>	-0.2242 <sup>ns</sup>	4.4820	0.2949	55.7415	0.0622 <sup>ns</sup>	0.2156 <sup>ns</sup>

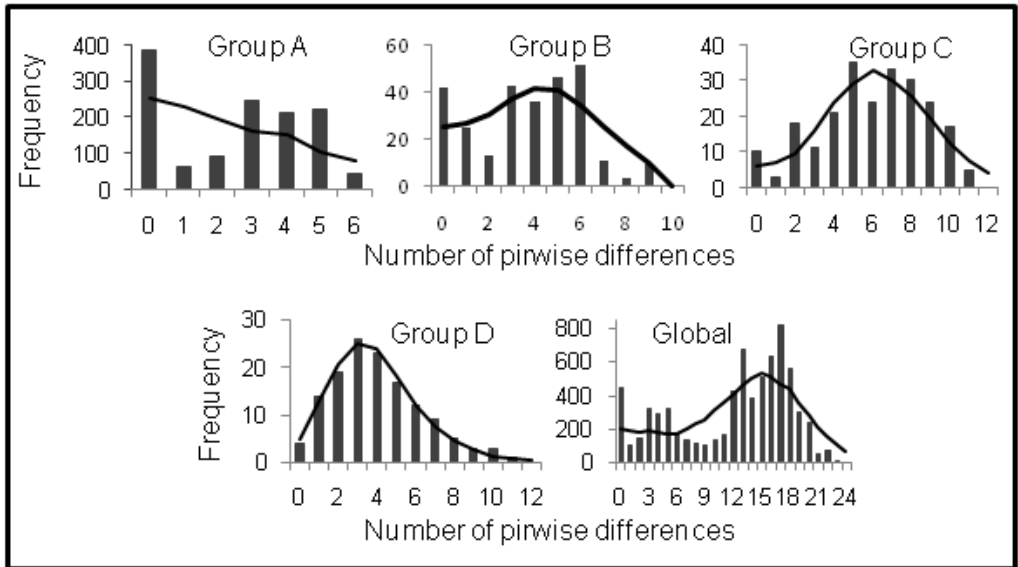
*F<sub>s</sub>*, Fu's statistic; *D*, Tajima's D test;  $\tau$ , time since expansion expressed in units of mutation times;  $\Theta_0$ , pre-expansion population size;  $\Theta_1$ , post-expansion population size; *SDD*, sum of squared deviations, *Hri*, Harpending's raggedness index. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ns = not significant.

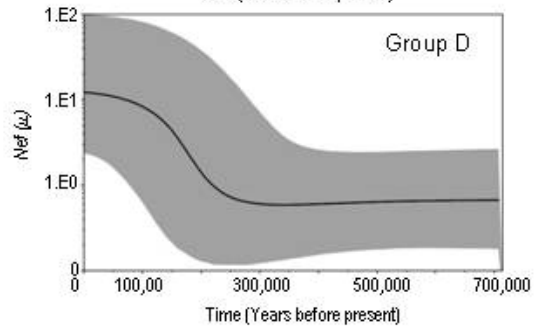
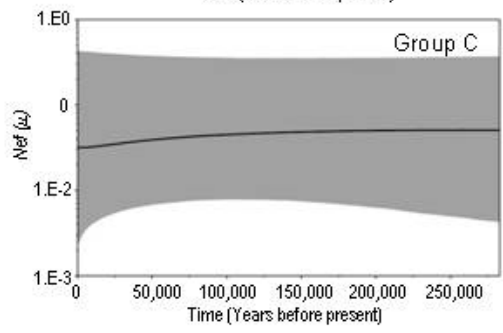
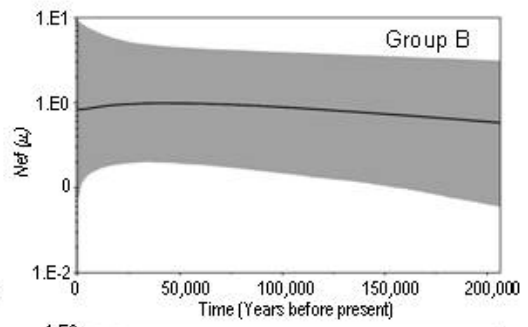
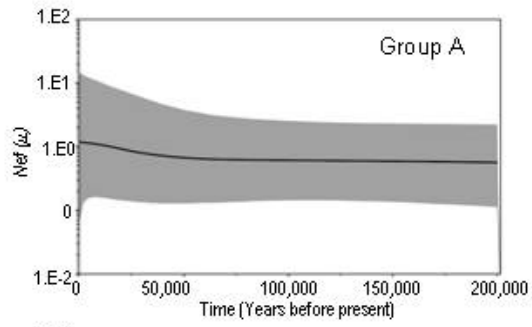














## Research note

Isolation and characterization of microsatellite loci in the Charal de Xochimilco *Chirostoma humboldtianum*Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites en el charal de Xochimilco *Chirostoma humboldtianum*

Rosa María García-Martínez<sup>1✉</sup>, Francisco Javier García-De León<sup>2</sup>, Omar Mejía<sup>3</sup> and Irene de los Ángeles Barriga-Sosa

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuicola, Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340 México, D. F., Mexico.

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética para la Conservación, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, 23096 La Paz, Baja California Sur, Mexico.

<sup>3</sup>Laboratorio de Variación Biológica y Evolución, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Colonia Casco de Santo Tomás, 11340 México, D. F., Mexico.

✉ rmgm2545@yahoo.com.mx

**Abstract.** Microsatellite loci were isolated and characterized for the endemic fish *Chirostoma humboldtianum* using an enrichment procedure. Eight polymorphic microsatellites were genotyped for 32 - 48 individuals from Tepuxtepec Dam, Michoacán. The number of alleles per locus ranged from 3 to 11 and the average observed and expected heterozygosities were 0.61 and 0.63, respectively. All loci deviated significantly from Hardy-Weinberg expectations, which might be related to small population sizes associated to human disturbances and habitat loss. These are the first loci described for the species and the genus and could be useful in studies of population genetics, conservation and management of the species.

**Key words:** Atherinopsidae, Hardy-Weinberg, null alleles, enrichment.

**Resumen.** Se aislaron y caracterizaron los loci microsatélites para el pez endémico *Chirostoma humboldtianum* a partir de una genoteca enriquecida. Se genotificaron 8 microsatélites polimórficos para 32 a 48 individuos de la presa Tepuxtec, Michoacán. El número de alelos por locus varió de 3 a 11 y la heterocigosidad observada y esperada promedio fue de 0.61 y 0.63, respectivamente. Todos los loci presentaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual puede deberse al tamaño poblacional pequeño asociado a disturbios humanos y pérdida del hábitat. Éstos son los primeros loci descritos para la especie y el género y podrían ser útiles en estudios de genética de poblaciones, conservación y manejo de la especie.

**Palabras clave:** Atherinopsidae, Hardy-Weinberg, alelos nulos, enriquecimiento.

The Charal de Xochimilco *Chirostoma humboldtianum* (Atherinopsidae: Menidiinae) is an endemic species from Central Mexico. In the last 6 decades their populations have been reduced or extirpated from some of their natural habitats as a result of habitat alteration (Barbour, 1973). However, the population size of this species has not been determined, and the population genetic structure remains unknown, thus, microsatellites markers can be useful addressing related questions. We isolated and characterized

8 polymorphic microsatellite loci for this species in order to increase our knowledge on the population structure and to test hypothesis about diversification and speciation that aid in defining strategies for the conservation and maintenance of the species.

Enrichment procedures were utilized to develop microsatellite genetic markers (Glenn and Schable, 2005). Out of 165- screened clones, 29 possessed repetitive elements that allow designing primers for 12 loci according to MSATCOMMANDER (Faircloth, 2008), the remaining 17 clones had flanking region that did not allow primer design. PCR reactions were carried

Recibido: 04 diciembre 2013; aceptado: 14 mayo 2014

out using 15 µl reactions containing 50 to 100 ng DNA, 10 pmol each primer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega), 200 µM of each dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1X PCR buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 75 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). PCR amplifications were performed in a BIO-RAD thermocycler as follows: 95° C for 5 min or 10 min, followed by 30 cycles of 15 sec at 94° C, 45 sec at 50° C to 60° C depending on the locus and 15 sec at 72° C, with a final extension at 70° C for 5 min. The PCR products were analyzed by capillary electrophoresis in the automatic sequencer ABI Prism 3100 Avant at Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) of the UAM-Iztapalapa. Allele sizes were determined using LIZ-500 as size standard (Applied Biosystems) and GeneMarker 2.4.0 software.

Polymorphism for each microsatellite loci was characterized by screening a sample of 32 to 48 individuals of *C. humboldtianum* from Tepuxtepec Dam, Michoacán (19°59'42" N, 100°13'33" W). The total number of alleles per locus, observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosities were calculated. All loci were tested for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and all pairwise combinations of loci were tested for linkage disequilibrium (LD). All these parameters and tests were computed in Arlequin version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010). Microchecker version 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to estimate the frequency of null alleles in the microsatellites

markers. The genotypes of the loci that showed null alleles were corrected using FreeNA (Chapui and Estoup, 2007). Finally, the *C. humboldtianum* population was evaluated in order to detect the occurrence of genetic bottleneck using TPM (two phases mutation) model and the Wilcoxon rank test as implemented in Bottleneck ver. 1.2.1 (Cornuet and Luikart 1996).

From the 12 amplified microsatellite loci, 4, Chum422, 443, 490 and 363 were monomorphic in all the individuals analyzed. The number of alleles per locus in the remaining 8 loci ranged from 3 (Chum21) to 10 (Chum496). Expected and observed heterozygosities ranged from 0.44 to 0.78 and 0.34 to 0.89, respectively (Table 1). No LD was detected between each pair of loci. All loci exhibited HWE departure after the sequential Bonferroni correction ( $\alpha = 0.05$ ,  $k = 8$ ). Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004) suggested that this phenomenon might be due to the presence of null alleles that were present in 3 of the 8 loci (Chum496, Chum450 and Chum358). However, the HWE departures were still observed after the genotyping correction using FreeNA. Deviation from HWE may be outcome of heterozygote deficiency found in some loci (Chum387, Chum411, Chum450, Chum358), which in turn might be caused by endogamy as has been suggested in other species of the genus (Barriga-Sosa et al., 2004). On the other hand, an excess of heterozygotes were detected in the remaining 4 loci. Heterozygosity excess has been

**Table 1.** Primer sequences and microsatellite repeat motifs for 8 microsatellite loci on *Chirostoma humboldtianum*. Annealing temperature ( $T_a$ ), number of individuals ( $n$ ), number of alleles ( $N_A$ ), observed and expected heterozygosities ( $H_O$  and  $H_E$ , respectively),  $p$  value for test of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P_{HW}$ ), expected null allele frequency (Null) and GenBank accession numbers

Locus and GenBank accession	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	$T_a$ (°C)	Allele size (pb)	$n$	$N_A$	$H_O$	$H_E$	$P_{HW}$	Null
Chum48 KF016982	F:GCTAGCAGAAGCCATCTAAGTC R:TCTACAGGCTCATGAAAGCAG	(CA) <sub>9</sub>	50	132-170	46	4	0.522	0.484	0.018*	-0.0289
Chum78 KF016983	F:TCCTCTCGCTGCTTCTCAC R:CCTTCTGTGGCCTTGCTTG	(CT) <sub>34</sub> (A) <sub>8</sub>	52	220-252	40	7	0.800	0.731	0.000*	-0.0452
Chum387 KF016984	F:AAGCTGCTGGACATTCTGC R:TTGCACACAGCTTAAGCACATG	(T) <sub>8</sub> (AC) <sub>12</sub> (CT) <sub>23</sub>	55	245-310	43	7	0.535	0.719	0.000*	-0.0106
Chum496 KF016985	F:CTTTGGCTGTGGGAGGAAG R:AGCAGCTGAGTGTGCGAAAC	(AG) <sub>4</sub> (T) <sub>17</sub>	57	134-169	42	10	0.786	0.778	0.000*	0.2658
Chum21 KF016986	F:CCATGGCTCAGGGTGGGC R:GTCGTGTGTGCTTTCTCGTCC	(GA) <sub>12</sub> GGGC(GA) <sub>10</sub>	58	78-106	46	3	0.891	0.625	0.003*	-0.1686
Chum411 KF016987	F:GCTTTGTGCCATATCAGTTCC R:ATTGGTGGCAATGACGTATG	(CT) <sub>21</sub> (T) <sub>8</sub> (GA) <sub>11</sub>	50	383-424	32	4	0.344	0.552	0.008*	-0.1055
Chum450 KF016988	F:AGGACAGATGCAGGGCAG R:GACACATGCGACACACGG	(G) <sub>10</sub>	60	229-250	48	9	0.604	0.712	0.000*	0.1357
Chum358	F:TCTCCGCTCATGTGTGTTTG R:AGATGGTAGCGTGAGCTGG	(AC) <sub>11</sub>	60	234-252	48	7	0.396	0.439	0.020*	0.0614

$p < 0.05$  after sequential Bonferroni corrections

associated with population bottleneck events (Cornuet and Luikart, 1996), and has also been a phenomenon suggested in other freshwater fish species inhabiting central Mexico (Dominguez-Dominguez et al., 2008). The bottleneck event could be associated to disturbances and habitat loss caused by human activities, which in turn might give result to small population sizes causing deviations from HWE. The TPM under Wilcoxon test did not show significant recent bottleneck (heterozygosity excess) ( $p = 0.187$ ). Likewise, decrease in observed heterozygosity suggests nonrandom mating and genetic drift (Loew et al., 2005), due that genetic drift causes random fixation and loss of alleles within population. In contrast, heterozygote excess appears to be due to the presence of hybrids within the sample (Pitchar et al., 2007) as has been earlier suggested for species of the genus (Barriga-Sosa et al., 2001). Translocations among populations and hybridization have been reported for this and others species of the genus (Alaye, 1996; Barriga-Sosa et al., 2001), however, this issues needs to be punctually addressed in further studies. These 8 microsatellite loci are the first developed for *C. humboldtianum* and will be useful in investigating population genetics, conservation, and management of this and closely related species.

This study is part of the doctoral research of Rosa María García Martínez at Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City; with fellowship Conacyt-224707. We thank PhD Rubén Valles and PhD Miguel Correa for laboratory assistance at CIBNOR and Biol. Ramón Cisneros for collecting specimens. Funding for this research was provided by Conacyt-CB-2009-01-130220 and UAM.147.07.03/147.09.01 granted to IDLABS. Mexican government kindly issued permit number DGOPA.07343.310810.4128 to conduct this research.

#### Literature cited

- Alaye, R. N. 1996. Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México, Instituto Nacional de la Pesca. *Ciencia Pesquera* 13:10-17.
- Barbour, C. D. 1973. A Biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia* 3:533-556.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., L. E. Eguiarte and J. L. Arredondo-Figueroa. 2004. Low but significant population subdivision of *Chirostoma grandocule* from Lake Pátzcuaro, Michoacán, Mexico. *Biotropica* 36:85-98.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., A. L. Ibáñez-Aguirre and J. L. Arredondo-Figueroa. 2001. Morphological and genetic variation in 7 species of the endangered *Chirostoma* "humboldtianum species group" (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Revista de Biología Tropical* 50:199-216.
- Chapuis, M. P. and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24:621-631.
- Cornuet, J. M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Dominguez-Dominguez, O., F. Alda, G. Pérez-Ponce de León, J. L. García-Garitaigotia and I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* Bean, 1898 (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. *BMC Evolutionary Biology* 8:161.
- Excoffier, L. and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- Faircloth, B. C. 2008. MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources* 8:92-94.
- Glenn, T. C. and N. A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395:202-222.
- Loew, S. S., D. F. Williams, K. Ralls, K. Pilgrim and R. C. Fleischer. 2005. Population structure and genetic variation in the endangered giant kangaroo rat (*Dipodomys ingens*). *Conservation Genetics* 6:495-510.
- Pitchar, V. L., K. Jones and D. E. Cowley. 2007. Estimation of introgression in cutthroat trout populations using microsatellites. *Conservation Genetics* 8:1311-1329.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.

## 15.3. ANEXO 3

Open Journal of Genetics, 2014, 4, 355-361  
Published Online September 2014 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/ojgen>  
<http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2014.45032>



# Isolation and Characterization of 26 Microsatellite Loci for the Shortfin Silverside Fish *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes 1835 (Atherinopsidae: Menidiinae) Derived from Next Generation Sequencing and Their Cross-Amplification in Central Mexican Atherinopsids

Barriga-Sosa Irene de los Angeles<sup>1\*</sup>, Rosa María García-Martínez<sup>1</sup>, Jhoana Díaz-Larrea<sup>2</sup>, Oscar Adrián Lozano Garza<sup>3</sup>, Francisco Javier García-De-León<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Planta Experimental de Producción Acuícola, Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México D.F., México

<sup>2</sup>Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México D.F., México

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética para la Conservación, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, México

Email: [ibs@xanum.uam.mx](mailto:ibs@xanum.uam.mx)

Received 10 June 2014; revised 9 July 2014; accepted 8 August 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

### Abstract

The endemic silverside fish *C. humboldtianum* is of great ichthyological, economical and cultural relevance in central Mexico and it has been suggested that it is among a group of other “peces blancos”, the most ancestral species. Here we characterized a set of 26 microsatellite loci from the species in order to further assess population and phylogeographic issues that aid in evaluating their highly impacted populations. From 58 primer pairs tested on specimens from Villa Victoria dam (Rio Balsas Basin), 26 loci positively amplified on the species and cross-primed on specimens of the closely related and threatened *Poblana alchichica*, *C. promelas* and *C. riojai*. Loci resolved medium and high genetic variation (mean  $N_A = 14.3$ , SD = 9.38; mean  $H_O$  &  $H_E = 0.47$ , SD = 0.32 and

\*Corresponding author.

**How to cite this paper:** de los Angeles, B.-S.I., et al. (2014) Isolation and Characterization of 26 Microsatellite Loci for the Shortfin Silverside Fish *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes 1835 (Atherinopsidae: Menidiinae) Derived from Next Generation Sequencing and Their Cross-Amplification in Central Mexican Atherinopsids. *Open Journal of Genetics*, 4, 355-361. <http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2014.45032>

0.58, SD = 0.32, respectively) and it is expected that these polymorphic loci are also useful in studying threatened atherinopsid species.

## Keywords

Endemic, Polymorphism, Villa Victoria, *Poblana alchichica*, *C. promelas*, *C. riojai*

## 1. Introduction

Up until the first half of the 20th century, atherinopsids were the main fishing product of the inland waters of Mexico and counted among the top scale fish species. The representative endemic genera of Atherinopsidae in Central Mexico are *Chirostoma* and *Poblana*, locally recognized as “charales” and “peces blancos” (silversides). *C. humboldtianum* included. The species is of great economic importance, because it has been used for decades as food by humans inhabiting the shores of Pátzcuaro and Chapala lakes and reservoirs in the States of Michoacán and Mexico. Although it is true that atherinopsids are of great interest as a substantial screeed in epicontinental fisheries capture, it is also true that the development and growth of artisanal fisheries in these regions lack of scientific basis and are rather based on the needs to supply high quality animal protein in short term. The species is composed by two morphotypes, clearly segregated into western and eastern populations and characterized by having differences in size, and in the mean values for median lateral and predorsal scales [1] [2]; and recognized as the hypothetical ancestral form of the “humboldtianum group” [1] [3]. During the last decades the populations of the species have been reduced or extirpated due to the introduction of non-native fish to the western basins [1] [2] [4]. Similarly, habitat loss, pollution and overfishing have played important roles in the decline and extinction of local populations of related species (*C. riojai*, *C. promelas*, *Poblana alchichica*) listed in the Official Mexican Standard NOM-059-Semarnat in 2010 and in the IUCN Red List.

A recent study on the population genetics of the species and based on sequences of the mitochondrial control region, described the species as highly differentiated and with intermediate levels of diversity [5]; and although the authors proposed the conservations of all the populations studied, they also pointed out the possible evolutionary stochastic effects and the limitation of defining conservation units only on the bases of mtDNA. Therefore, eight polymorphic microsatellite loci were developed [6] based on an enrichment method [7] in order to further assess and confirm the diversity and structure of the species. Furthermore and with the aim of developing a larger set of genetic codominant markers available to study the silversides of México, a recently diverged group of fishes [8] [9], here we characterized 26 additional polymorphic loci for the species and using Next Generation Sequencing and successfully cross-amplified them in closely related species with the aim of their use in assessing further population genetics and phylogeographic issues that can aid in the conservation and management of atherinopsids.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microsatellite Isolation

Genomic DNA was extracted from muscle tissue of one individual of *C. humboldtianum* using a salt extraction protocol [10] and sent to the Georgia Genomics Facility (University of Georgia, Athens, USA) for sequencing. The specimen was deposited in the Colección Nacional de Peces Dulceacuicolas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN (ENCB-IPN-P6423). DNA was sheared using a Covaris S2, and Illumina adapters were ligated on using methods derived from [11] but using adapters equivalent to Illumina TruSeq with 10 nt indexes [12]. Libraries were pooled and run on the Illumina HiSeq 2000 (paired-end 100 reads). Resulting fastq files were demultiplexed, and reads were filtered and run through the PALfinder pipeline for microsatellite identification and primer design [13]. Over 10 million reads at 100 bp were obtained, covering approximately  $1.3^{12}$  bases and resolving  $3\times$  genome coverage. Detected reads with microsatellites were 108, 228, of which 0.16% presented primers. Further primer sorting was as follow: 1) all loci with primers that were found more than once were deleted, particularly most of the really long (>500 bp) and short dinucleotide repeats (<24 bp); 2) removal of the longest repeats. Suitable primer design was possible in 1153 pairs with repeats of mid-length. Fifty eight pairs of primers were selected on the bases of the following parameters: a) length (18 - 30 bp), b) G-C content (40% -



60%), c) melting temperature (55°C - 65°C), d) 3'-stability, e) avoid hairpin or dimer formation and f) no self-priming, and tested for polymorphism.

## 2.2. Sampling

Mexican government kindly issued permit number DGOPA.07343.310810.4128 to conduct this research. Organisms from Villa Victoria were obtained from commercial artisanal catches. *C. riojai* and *P. alchichica* specimens were kindly donated by Gerardo Figueroa Lucero and Héctor Espinoza, respectively. Gill lamella tissue samples from *C. promelas*, *C. sphyraena*, *C. grandocule* and *C. jordani* were obtained from the Tissue collection of the Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Planta Experimental de Producción Acuícola, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

## 2.3. DNA Extraction, PCR Amplification and Analysis

Total DNA was isolated as previously described from 30 *C. humboldtianum* from Villa Victoria Dam, State of Mexico (19°26'N, 100°00'W) and 22 specimens of *Chirostoma* and *Poblanaalchichica* (Table 1) to test cross-amplification.

**Table 1.** Cross-amplification of 26 microsatellite loci of *Chirostoma humboldtianum* in five species of *Chirostoma* and one *Poblana* species. Sample size in parenthesis.

	<i>C. jordani</i> Xochimilco Channels (N = 4)	<i>C. sphyraena</i> Chapala lake (N = 4)	<i>C. riojai</i> Ignacio Ramírez (N = 4)	<i>C. grandocule</i> Pátzcuaro Lake (N = 4)	<i>C. promelas</i> Chapala Lake (N = 2)	<i>P. alchichica</i> Alchichica, Puebla (N = 4)
Chum07	++	++	++	++	++	++
Chum10	+	+	+	++	-	-
Chum11	+	+	++	++	++	++
Chum12	+	++	++	++	++	++
Chum14	+	++	++	++	-	++
Chum15	++	++	-	++	-	-
Chum18	++	++	++	++	++	++
Chum27	+	++	++	++	++	++
Chum30	++	++	++	+	-	++
Chum33	++	++	++	++	++	++
Chum39	++	++	++	++	++	++
Chum44	++	++	++	++	+	++
Chum48	++	++	++	++	+	++
Chum53	++	++	++	++	++	++
Chum55	++	-	++	++	+	++
Chum56	++	+	++	++	++	++
Chum57	++	++	++	++	++	++
Chum58	++	++	++	++	+	+
Chum59	++	+	++	++	-	++
Chum60	++	++	++	++	++	++
Chum62	++	++	++	++	++	++
Chum63	++	++	++	++	++	++
Chum65	++	++	++	++	+	++
Chum68	+	++	++	++	+	++
Chum69	++	++	++	++	++	++
Chum70	++	+	++	-	-	++
++	77%	77%	92%	92%	54%	88%
+	23%	19%	4%	4%	23%	4%
Proportion Polymorphic Loci	77%	88%	84%	88%	50%	63%

For *C. promelas* ++ = 2 genotypes recorded; + = 1 genotype; for *C. jordani*, *C. sphyraena*, *C. riojai*, *C. grandocule* and *P. alchichica* ++ = 3 - 4 genotype products recorded; + = 1 - 2 genotypes; - = no amplification success when n = 4 or n = 2.

PCR were performed in 10  $\mu$ l reaction, containing 40 ng DNA, 1 $\times$  PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM dNTPs, 0.2  $\mu$ M each primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.25 - 0.35 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cycling conditions included: 95°C 5 min, 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the locus-specific annealing temperature ( $T_m$ ) (Table 2), 40 s at 72°C, and a final 72°C extension for 15 min and using an iCycler (BIORAD Laboratories, Hercules, CA, USA). PCR products were visualized by silver staining in 6% polyacrylamide gels (7.5 M urea). Allele sizes were determined using 10 bp ladder (Invitrogen). Cross-species PCR amplifications required a reduction on the stringency of reactions on some loci, carried out lowering 1 or 2 grades the  $T_m$ .

**Table 2.** Primer sequences and characteristics of 26 microsatellite amplified in 30 individuals of *Chirostoma humboldtianum* (Ch) from Villa Victoria dam.

Locus	Genbank accession number	PCR primers sequence <sup>a</sup>	SSR motif	$T_m$ (°C)	Allelic range (Ch)	$N_A$	$H_O$	$H_E$	Allelic range all samples	$N_A$ all samples
Chum07	KM099040	F: GGCCAGATGTGGATCTCTTAGC R: CAGTGTGTCTGAGATGGAGCG	(TTC) <sub>17</sub> (AC) <sub>26</sub>	55	127 - 139	2	0.519	0.475	127 - 149	9
Chum10	KM099041	F: TTAATAGGGGAGATCGAGGCG R: TTCCTCAAGAAAAGTCACCAGC	(TTCC) <sub>28</sub>	58	144 - 156	4	0.444	0.474	144 - 156	4
Chum11	KM099042	F: CATGCACAGCCTTAAAAGACG R: AAAGTTCTGACTACCCACGC	AC(40) AC(68)	58	111 - 167	14	0.462	0.856*	111 - 183	21
Chum12	KM099043	F: TGACCCCGGATAAACTGTGG R: CATGAGGATTCCAAGGGC	(ATGG) <sub>44</sub> (ATGG) <sub>44</sub>	58	125 - 185	10	0.815	0.869	117 - 185	14
Chum14	KM099044	F: TCATTGTCAGTGTGTATGTGCG R: TAAACTGAGTGGGAAAGGGC	(AC) <sub>42</sub> (AC) <sub>30</sub>	52	118 - 168	19	0.815	0.208	118 - 168	21
Chum15	KM099045	F: GAGCACTGGGAGATAATGAACC R: AACTCCTAGAATGTGCATCACC	(ATT) <sub>72</sub>	55	149 - 212	15	0.778	0.073	149 - 253	20
Chum18	KM099046	F: CCTCCTTTCCTCTGTTTTCC R: GATCCGAAGCTCTTAAAGCCC	(TCC) <sub>27</sub> (TCC) <sub>30</sub>	60	116 - 137	4	0.074	0.561*	107 - 180	11
Chum27	KM099047	F: TGTGGAAGATGGAGATGTGG R: ACATACTATTAAGTAAAAGTAC ATTGAGC	(AT) <sub>42</sub> (AT) <sub>48</sub>	52	106 - 156	15	0.231	0.936*	106 - 156	18
Chum30	KM099048	F: GAAGGAGTGTGGAGCAGGG R: CAGTCCTGTTCTGATCCGC	(TCC) <sub>24</sub> (TCC) <sub>24</sub> (TC) <sub>24</sub>	60	115 - 147	6	0.400	0.108*	105 - 147	12
Chum33	KM099050	F: CTCCTGCCTCACCTTCATCC R: TGTTATGCTGTCAGTGACCC	(TCC) <sub>24</sub>	64	131 - 139	2	0.000	0.845	119 - 140	7
Chum39	KM099051	F: ACGTCAGGGTAAGGGTTGGC R: GTACCGGCCCAAAGTTTACG	(AC) <sub>40</sub>	64	156 - 172	8	0.259	0.944*	150 - 172	11
Chum44	KM099053	F: AGGGAGGTCTGAAGTCGTGC R: TTGTTGCCAAACGTCTGAGG	(AAAG) <sub>48</sub>	62	160 - 270	21	0.889	0.927	158 - 328	30
Chum48	KM099054	F: TTCTAGTTCCTCCTGTTAGCATCG R: AGGAACCAGTGCCAGACC	(TTCC) <sub>32</sub>	61	159 - 191	3	0.037	0.583	155 - 219	11
Chum53	KM099055	F: AAACCTACCCGAAGCGAGACG R: TGTCTGCCGATAAACAGTTTCC	(ATGG) <sub>24</sub>	60	274 - 274	1	0.000	-	128 - 274	3
Chum55	KM099056	F: AGGGCAGCGCATTTTACG R: AGAGTGCTCAGAGGCAAAGG	(AAAG) <sub>24</sub>	57	322 - 354	10	0.846	0.802	322 - 418	17
Chum56	KM099057	F: TGAGATCCCAGCTCAGTCC R: GAAAGGACAGCGGTCAGC	(ACTG) <sub>24</sub>	57	146 - 158	4	0.333	0.300	142 - 166	6

## Continued

Chum57	KM099058	F: CTGATAACAAGCGTGGGAGG R: TTTAATCTGAGGGGAAGAGATGG	(AAAT) <sub>24</sub>	61	148 - 160	4	0.481	0.535	148 - 160	4
Chum58	KM099059	F: CAGAGGAAACGGAGAGTGTAGC R: CAGCGAAAACAGATACATAAAG ACC	(ATCT) <sub>24</sub>	61	253 - 363	22	0.926	0.942	253 - 363	22
Chum59	KM099060	F: GGCACCTCAAACGACACAAGC R: CGGCCGGTGTCCAATAGC	(ATAC) <sub>24</sub>	60	115 - 139	4	0.154	0.215	115 - 143	6
Chum60	KM099061	F: CTTTGACCATGACTGACTGG R: ATGTTCTGTACACCAACGACCC	(ATGG) <sub>28</sub>	61	265 - 301	10	0.889	0.855	237 - 321	21
Chum62	KM099062	F: TTCCAAGGCTTCATTGTAAGG R: CGACAGGAAAGTGAAAAGG	(AAAG) <sub>28</sub>	57	289 - 361	16	0.846	0.937	289 - 401	29
Chum63	KM099063	F: CACTCCTCCTATGTCCTCC R: GCTGTGGACTGAAGTTTAGATGC	(AAAT) <sub>28</sub>	58	228 - 256	5	0.115	0.184	228 - 256	6
Chum65	KM099064	F: TCCCAGTGCTGCAGAAAGC R: GGGCCCTAAAAGCTGTCACC	(AAAG) <sub>32</sub>	61	183 - 199	4	0.519	0.476	175 - 199	5
Chum68	KM099065	F: GCTTTGCTGCAACGGACC R: CTGCCAGCTAGCAAGTTACCC	(ATCT) <sub>36</sub>	58	234 - 386	25	0.846	0.968*	234 - 406	39
Chum69	KM099066	F: GCATGAAGCAGAACATTAACC R: CAGAGTTCAGTCAAAGGAGAGC	(AAAT) <sub>40</sub>	58	206 - 310	12	0.630	0.783	202 - 330	21
Chum70	KM099067	F: GGATTAGTCGAACAAATCAAACC C R: CCAACATCGGTTGTGAAACG	(ATAC) <sub>48</sub>	58	107 - 123	3	0.111	0.234	107 - 127	5

\*Significant deviation from HWE ( $p < 0.05$ ); AN = Accession number; Forward primers were 5' labeled with the M13 sequence (5'TGTAAAACGA CGGCCAGT), for further fluorescence detection.

Potential presence of null alleles was assessed in Free  $N_A$  [14]. Alleles per locus ( $N_A$ ) and observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosities were calculated using deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, linkage disequilibrium was estimated and tested using GENEPOP 4.0.10 [15] under default parameters. Multiple hypothesis tests  $p$  values were adjusted by the False Discovery Rate (FDR) method [16]. In order to gain information on the possible utility of these loci in the closely related species assayed, the percentage of polymorphism per species (%) was obtained by accounting only those loci that resolved more than one allele per locus and within each species.

### 3. Results and Discussion

Among 58 primers tested, 26 microsatellites screened successfully, 25 resolved as polymorphic and Chum53 was monomorphic in specimens from Villa Victoria. Mean number of alleles in the polymorphic loci was 14.3, SD = 9.38, a mean number 2× higher than the resolved earlier for the species (see [6]; 6.4, SD = 2.5), but similar to those characterized closely related species [17] [18]; and  $H_O$  and  $H_E$  0.47, SD = 0.32 and 0.58, SD = 0.32, respectively. These later values are similar to those previously reported (see [6]; 0.61, SD = 0.19 and 0.63, SD = 0.12, for  $H_O$  and  $H_E$ , respectively). Linkage disequilibrium was detected for a pair of loci within specimens from the population (Chum15 and Chum39,  $p = 0.00$ ). Null allele frequency estimates were negligible for half of the loci, moderate ( $>0.05$  and  $<0.20$ ) for 12 loci (Chum11, Chum14, Chum18, Chum30, Chum33, Chum39, Chum48, Chum59, Chum63, Chum68, Chum69 and Chum70) and high at one locus (Chum27 = 0.357). Significant deviation from HWE was detected in six loci ( $p < 0.05$ , Table 2). This deviation might result from the heterozygote deficiency found in some loci (Chum11, 18, 27, 30 & 39), which in turn might be caused by endogamy as has been earlier suggested for the species [5] and in other species of the genus [19] [20].

Cross-PCR amplifications of 22 individuals of *Chirostoma* and *Poblana* resulted in 16 polymorphic loci and the remaining 10 loci resolved genotypes in most of the species (see Table 1). For instance Chum 07, 18, 33, 39, 53, 57, 60, 62, 63 and 69 resolved genotypes in 3 or 4 individuals (++) of each of the six screened species, excepted for *C. promelas*, for which the number of specimens analyzed was two; Chum 12, 27, 44, 48, 56 and 65, rendered genotypes (++) in five of the species and genotypes (+) in one species per locus. Chum 11, 58 and 68, resolved genotypes (++) in four species and (+) in two species; Chum 14, 30, 55 and 59, also resolved genotypes (++) in four species and (+) in another species, however these loci did not amplified neither in *C. promelas* or *C. sphyraena*; the remaining loci amplified genotypes (++) or (+) in one to three species and did not amplified in other two or three species. Although eight microsatellite loci have been recently developed for the species (see [6]), these 26 new microsatellite loci are the first to be tested in cross-amplification between the Mesa Central Atherinopsids and will be helpful tools for genetic population and phylogeographic studies of *C. humboldtianum*, as well as in paternal assignments for culture purposes, studies all that can aid in developing a conservation plan for this important species, which although is among the group known as “pecesblancos” the species with the widest distribution (see [19]), some of its populations have been reduced or extirpated due to habitat loss, pollution and overfishing (see [19]). These markers will also aid in investigating the integrity of stocks/populations for management and conservation of related endangered species.

### Acknowledgements

Funding for this research was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CB-2009-01-130220 and UAM.147.07.03/147.09.01 granted to IDLABS. This work was completed by Irene D. L. A. Barriga-Sosa during her sabbatical leave in CCA-UAA.

### References

- [1] Barbour, C.D. (1973) A Biogeographical History of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A Species Flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 3, 533-556. <http://dx.doi.org/10.2307/1443118>
- [2] Barbour, C.D. (1973) The Systematic and Evolution of the Genus *Chirostoma* Swainson (Pisces: Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany*, 18, 97-141.
- [3] Echelle, A.A. and Echelle, A.F. (1984) Evolutionary Genetics of a Species Flock: Atherinid Fishes on the Mesa Central of México. In: Echelle, A.A. and Kornfield, I., Eds., *Evolution of Fish Species Flocks*, University of Maine, Orono, 93-110.
- [4] Alvarez, J. and Navarro, L. (1957) Los peces del valle de México. Secretaría de Marina, Instituto Nacional de Pesca, Dirección de Pesca e Industrias Conexas, México City.
- [5] García-Martínez, R.M., Mejía, O., García de León, F.J. and Barriga-Sosa, I.D.L.A. Extreme Genetic Divergence in the Threatened Endemic Fish *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835): Implications for Its Conservation.
- [6] García-Martínez, R.M., García De León, F.J., Mejía, O. and Barriga Sosa, I.D.L.A. (2014) Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in the “Charal de Xochimilco” *Chirostoma humboldtianum*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*.
- [7] Glenn, T.C. and Schable, N.A. (2005) Isolating Microsatellite DNA Loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202-222. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95013-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95013-1)
- [8] Bloom, D.D., Weir, J.T., Piller, K.R. and Lovejoy, N.R. (2013) Do Freshwater Fishes Diversify Faster than Marine Fishes? A Test Using State-Dependent Diversification Analyses and Molecular Phylogenetics of New World Silversides (Atherinopsidae). *Evolution*, 67, 2040-2057. <http://dx.doi.org/10.1111/evo.12074>
- [9] Bloom, D.D., Piller, K.R., Lyons, J., Mercado-Silva, N. and Medina-Nava, M. (2009) Systematics and Biogeography of the Silverside Tribe Menidiini (Teleostomi: Atherinopsidae) Based on the Mitochondrial ND2 Gene. *Copeia*, 2, 408-417. <http://dx.doi.org/10.1643/CI-07-151>
- [10] Aljanabi, S.M. and Martinez, I. (1997) Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692-4693. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- [11] Fisher, S. Barry, A., Abreu, J., Minie, B., Nolan, J., Delorey, T.M., Young, G., Fennell, T.J., Allen, A., Ambrogio, L., Berlin, A.M., Blumenstiel, B., Cibulskis, K., Friedrich, D., Johnson, R., Juhn, F., Reilly, B., Shammass, R., Stalker, J., Sykes, S.M., Thompson, J., Walsh, J., Zimmer, A., Zwirko, Z., Gabriel, S., Nicol, R. and Nusbaum, Ch. (2011) A Scalable, Fully Automated Process for Construction of Sequence-Ready Human Exome Targeted Capture Libraries. *Genome Biology*, 12, R1. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2011-12-1-r1>
- [12] Faircloth, B.C. and Glenn, T.C. (2012) Not All Sequence Tags Are Created Equal: Designing and Validating Sequence

- Identification Tags Robust to Indels. *PLoS One*, 7, Article ID: e42543.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042543>
- [13] Castoe, T.A., Poole, A.W., de Koning, A.P.J., Jones, K.L., Tomback, D.F., Oyler-McCance, S.J., Fike, J.A., Lance, S.L., Streicher, J.W., Smith, E.N. and Pollack, D.D. (2012) Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS One*, 7, Article ID: e30953.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030953>
- [14] Chapuis, M.-P. and Estoup, A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621-631. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- [15] Rousset, F. (2008) Genepop'007: A Complete Re-Implementation of the Genepop Software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- [16] Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, 289-300.
- [17] Sbrocco, E.J. and Barber, P.H. (2011) Ten Polymorphic Microsatellite Loci for the Atlantic Silverside, *Menidiamentia*. *Conservation Genetic Resources*, 3, 585-587.
- [18] Beheregaray, L.B. and Sunnucks, P. (2000) Microsatellite Loci Isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* Species Group and Their Use in Other South American Silverside Fish. *Molecular Ecology*, 9, 629-644.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00882.x>
- [19] Barriga-Sosa, I.D.L.A., Ibañez, A.A.L. and Arredondo-Figueroa, J.L. (2002) Morphological and Genetic Variation on Seven Species of the Endangered *Chirostoma "humboldtianum" Species Group* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *International Journal of Tropical Biology and Conservation/Revista de Biología Tropical*, 50, 199-216.
- [20] Barriga-Sosa, I.D.L.A., Eguarte, L.E. and Arredondo-Figueroa, J.L. (2004) Low but Significant Population Subdivision of *Chirostomagrandocule* from Lake Patzcuaro, Michoacan, Mexico. *Biotropica*, 36, 85-98.