

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**"Revisión taxonómica y filogenia molecular de la familia
Profundulidae (Teleostei: Cyprinodontiformes)"**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Doctora en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación de Ecosistemas Tropicales**

PRESENTA

SARA ELIZABETH DOMÍNGUEZ CISNEROS



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre, 2023

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**"Revisión taxonómica y filogenia molecular de la familia
Profundulidae (Teleostei: Cyprinodontiformes)"**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Doctora en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación de Ecosistemas Tropicales**

PRESENTA

SARA ELIZABETH DOMÍNGUEZ CISNEROS

DIRECTOR

DR. RODOLFO PÉREZ RODRÍGUEZ

Facultad de Biología
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

CODIRECTOR

DR. OMAR DOMÍNGUEZ DOMÍNGUEZ

Facultad de Biología
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

ASESOR

DR. GUSTAVO RIVERA VELÁZQUEZ

Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 06 de noviembre de 2023

Oficio No. SA/DIP/939/2023

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Sara Elizabeth Domínguez Cisneros

CVU: 340869

Candidata al Grado de Doctora en Ciencias en Biodiversidad y

Conservación de Ecosistemas Tropicales

Instituto de Ciencias Biológicas

UNICACH

Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado **Revisión taxonómica y filogenia molecular de la familia Profundulidae (Teleostei: Cyprinodontiformes)** cuyos Directores de tesis son el Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez (CVU: 170002) y Codirector Dr. Omar Domínguez Domínguez quienes avalan el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

Atentamente

"Por la Cultura de mi Raza"

Dra. Carolina Orantes García

Directora



**DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

C.c.p. Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez, Directora del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.
Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro, Coordinador del Posgrado, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.
Archivo/minutario.

RJAG/COG/igp/gr

2023 AÑO DE FRANCISCO VILLA
EL REVOLUCIONARIO DEL PUEBLO

**Dirección de
Investigación
y Posgrado**

Dirección de Investigación y Posgrado
Libramiento Norte Poniente No. 1150
Colonia Lajas Maciel C.P. 29039
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
Tel:(961)6170440 EXT.4360
investigacionyposgrado@unicach.mx

DEDICATORIAS

A mis tres grandes amores...

Mi esposo: Ernesto Velázquez Velázquez

Mi hija: Jennifer Velázquez Domínguez

Mi hijo: Ernesto Velázquez Domínguez



AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a Dios por permitirme llegar hasta este momento y siempre acompañarme ¡Gracias Padre!

A mi esposo Ernesto, por todo su amor y apoyo incondicional. A mis dos hijos Jenny y Ernestito, por su amor y comprensión siempre.

Al Dr. Omar Domínguez Domínguez, por haber aceptado participar en este proyecto; sin su ayuda no hubiera logrado éste trabajo. Mi agradecimiento, respeto y admiración para él.

Al Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez, por todo el apoyo brindado durante la investigación.

Al Dr. Gustavo Rivera Velázquez, por brindarme siempre su ayuda en éste proceso.

Al Dr. Ernesto Velázquez Velázquez, por ser mi guía y mi apoyo. Cada vez te admiro más.

Especialmente a las Dras. Gloria Solís Guzmán, Rosa Gabriela Beltrán López, y Eloisa Torres Hernández por todo el apoyo que me brindaron y por compartir sus conocimientos con mi persona.

Agradezco también al comité sinodal: el Dr. Abraham Kobelkowsky Díaz, Dr. Gorgonio Ruiz Campos, Dr. Gustavo Rivera Velázquez, Dr. Emilio Ismael Romero Berny y Dr. Esteban Pineda Diez de Bonilla; por sus comentarios y observaciones realizadas a mi trabajo.

A todos mis maestros, compañeros de trabajo y amigos del Instituto de Ciencias Biológicas por brindarme su apoyo durante ésta etapa de mi vida.

Finalmente, a toda mi familia: hermanos, sobrinos, tíos y suegros, por su incondicional amor y comprensión, al no estar para ustedes durante éste proceso. Y especialmente agradezco a mi papá José Irene Domínguez, por su infinito amor que siempre llevo en mi corazón, ¡gracias papá!

Agradecimiento muy especial al PRODEP, por el recurso asignado (beca parcial) a través de la Convocatoria de Apoyo para estudios de posgrado de alta calidad, en el marco del Programa para el Desarrollo Profesional Docente y a la Dirección General de Educación Superior Universitaria e Intercultural (DGESUI) a través de la Dirección de Fortalecimiento Institucional (DFI-7398-22); para realizar el Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), ciclo escolar 2019 - 2023.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-------|
| I. RESUMEN..... | 1,2 |
| II. ABSTRACT..... | 3,4 |
| III. INTRODUCCIÓN..... | 5-9 |
| IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS..... | 10,11 |
| V. OBJETIVOS..... | 12 |
| VI. PLAN DE ESTUDIO | 13,14 |
| VII. CAPÍTULO I..... | 15-37 |
| VIII. CAPÍTULO II..... | 38-47 |
| IX. CAPÍTULO III..... | 48-68 |
| X. DISCUSIÓN GENERAL..... | 69-73 |
| XI. CONCLUSIONES GENERALES..... | 74-75 |
| XII. LITERATURA GENERAL..... | 76-80 |

I. RESUMEN

La familia Profundulidae es un grupo de peces de agua dulce, con una distribución geográfica muy limitada que se extiende desde el sur de México a Centroamérica. La familia es también una de las menos diversas dentro del orden Cyprinodontiformes (Killis, cachorritos y escamudos), con 15 especies descritas en comparación con las 353 especies nominales en Poeciliidae y 59 en Goodeidae, esta última su grupo hermano. La taxonomía de los peces profundúlidos ha sido relativamente cambiante en los últimos dos siglos; hasta la década pasada la familia estaba integrada por un solo género nominal, *Profundulus*, que se dividía en dos grupos o subgéneros (*Tlaloc* y *Profundulus*). Análisis moleculares recientes se han utilizado como justificación para erigir estos subgéneros a géneros; sin embargo se carecen de los análisis morfológicos que diagnostiquen a ambos géneros; además, parte de la problemática taxonómica de la familia se debe a la gran homogeneidad morfológica que presentan las especies, lo que ha permitido la identificación de linajes genéticos independientes y especies crípticas que estaban enmascaradas debido a la poca variabilidad morfológica externa, particularmente dentro del género *Profundulus*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es generar una diagnosis detallada de los géneros y una clave dicotómica para la identificación de las especies de la familia Profundulidae, basada en la morfología. Así mismo, se analizaron las relaciones filogenéticas de la familia Profundulidae ampliando el muestreo taxonómico y completando el ámbito de distribución de varios taxones, utilizando la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa (ND2) del genoma mitocondrial, con el propósito de reconstruir las relaciones filogenéticas entre las especies y evidenciar la presencia de nuevos linajes; además, se describe una nueva especie dentro del género *Profundulus* (*P. adani*); con material proveniente de los drenajes de las cabeceras de la cuenca del Río Papaloapan, en el estado mexicano de Oaxaca. Los resultados más relevantes mostraron una diferenciación morfológica entre los géneros; el género *Tlaloc* se diagnostica con base en cinco caracteres autapomórficos, entre ellos, el mesetmoides prominente y de forma oval, sus bordes exceden el margen posterior del vómer; la porción anterior del parasfenoides está en contacto con el mesetmoides y sobrepasa la parte media de este; la fosa autopterótica es reducida. *Profundulus* es diagnosticado con base en seis caracteres morfológicos únicos, entre ellos el mesetmoides pequeño, en forma de media luna, y no excede los márgenes del vómer; la porción anterior del parasfenoides, justo en contacto con el mesetmoides y no va más allá de la parte medial de este último hueso; la fosa autopterótica grande. La descripción y los ámbitos de distribución para cada género, así como una clave para la identificación de las especies, son aportadas en este estudio. Un nuevo taxón *Profundulus adani* es descrito aquí para la cuenca alta

del río Papaloapan en el estado mexicano de Oaxaca; su estatus específico está respaldado por evidencia morfológica y molecular. Una combinación de patrones de coloración y conteos separan a *P. adani* de sus congéneres. Con una marcada divergencia molecular del 21.1% recuperamos a los dos únicos géneros de la familia Profundulidae (*Tlaloc* y *Profundulus*) como grupos naturales. De las nueve especies reconocidas para *Profundulus* y cuatro especies reconocidas para *Tlaloc*, se recuperaron siete y tres respectivamente, además de tres linajes nuevos, bien diferenciados. Entre otras implicaciones se sugiere la sinonimización de algunos taxa, así como la amplitud de distribución de otros. La información obtenida en el presente trabajo con las herramientas morfológicas y moleculares ha arrojado información relevante para el conocimiento de la taxonomía y sistemática de la familia Profundulidae. A partir de los resultados obtenidos se sientan las bases para proponer una clasificación más comprensiva de este grupo, además se infieren las relaciones de parentesco entre los géneros y las especies actualmente reconocidas y finalmente se propone un modelo de mayor diversidad de especies (15 especies), para la familia Profundulidae.

Palabras clave: Clave dicotómica, morfología, Profundulidae, sistemática, taxonomía.

II. ABSTRACT

The family Profundulidae is a group of freshwater fish, with a very limited geographical distribution extending from southern Mexico to Central America. The family is also one of the least diverse within the order Cyprinodontiformes (killifish, pupfish and escamudos), with only fifteen described species, compared to the 353 nominal species in Poeciliidae and 59 in Goodeidae, the latter its sister group. The taxonomy of profundulid fish has been relatively changeable over the last two centuries; until the last decade the family was composed of a single nominal genus, *Profundulus*, which was divided into two groups or subgenera (*Tlaloc* and *Profundulus*). Newly discovered molecular data have been used to justify the elevation of these subgenera to genera; however, morphological analyses diagnosing both genera are lacking; in addition, part of the taxonomic problem of the family is due to the great morphological homogeneity of the species, which has allowed the identification of independent genetic lineages and cryptic species that were masked due to little external morphological variability, particularly within the genus *Profundulus*. Therefore, the aim of this study is to provide accurate descriptions of morphological characters in *Profundulus* and *Tlaloc*, and to discover additional informative characters to diagnose and characterize both genera. A dichotomous key for the identification of the species of the family Profundulidae is presented. Likewise, the phylogenetic relationships of the family Profundulidae were analyzed, the taxonomic sampling is extended and completing the range of distribution of some taxa, using subunit 2 of NADH dehydrogenase (ND2) of the mitochondrial genome, for the purpose of reconstructing phylogenetic relationships between species and evidencing the presence of new lineages; in addition, a new species is described within the genus *Profundulus* (*P. adani*); with material from the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican state of Oaxaca. The most relevant results showed a morphological differentiation between the genera. The genus *Tlaloc* is diagnosed on the basis of five unique characters, among which are the prominent and ovalshaped mesethmoid, exceeding the posterior margins of the vomer; the anterior portion of the parasphenoid making contact with the mesethmoid and extend beyond the center of the mesethmoid; and a reduced autopterotic fossa. *Profundulus* is diagnosed here based on the following characters: the mesethmoid is small, crescent-shaped, and does not extend beyond the margins of the vomer; the anterior portion of the parasphenoid just contacting the mesethmoid and not extending beyond the center of the mesethmoid; a large autopterotic fossa. For each genus, description and distribution ranges are provided as well as a key for identification of the species. *Profundulus adani*, new species, is described from the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican state of Oaxaca. The

uniqueness of this new species is supported by morphological and molecular evidence. *P. adani*, new species, is distinct from its congeners by a combination of color patterns and counts. With a marked molecular divergence of 21.1% we recovered the only two genera of the family Profundulidae (*Tlaloc* and *Profundulus*) as natural groups. Of the nine species recognized for *Profundulus* and four species recognized for *Taloc*, seven and three respectively were recovered, in addition to three well-differentiated new lineages. Among other implications is suggested the synonymization of some taxa, as well as the extension range of others. The information obtained in the present research work, using molecular and morphological tools, has yielded relevant information for the knowledge of the taxonomy and systematic of the family Profundulidae. On the basis of the results obtained, the basis has been laid for proposing a more comprehensive classification of this group, also infer the relationship between genera and species currently recognized and finally proposed a model of greater diversity of species (15 species), for the family Profundulidae.

Keywords: Identification key, morphology, Profundulidae, systematic, taxonomy.

III. INTRODUCCIÓN

La familia Profundulidae Hoedeman & Bronner, 1951 (Van der laan *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2016) es un grupo de peces de agua dulce con una distribución geográfica muy limitada que se extiende desde el sur de México a Centroamérica (Miller, 1955; Parenti, 1981; Morcillo *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016). La familia es también una de las menos diversas dentro del orden Cyprinodontiformes (Killis, cachorritos y escamudos), con 15 especies descritas (Domínguez-Cisneros *et al.*, 2023; Calixto-Rojas *et al.*, 2023) en comparación con las 353 especies nominales en Poeciliidae y Goodeidae, esta última su grupo hermano (Nelson, 2016; Piller *et al.*, 2022).

Los peces profundúlidos son uno de los elementos distintivos de la fauna endémica de América Central y el sur de México (Matamoros *et al.*, 2012; Morcillo *et al.*, 2016) y la mayoría de las especies tienen ámbitos de distribución muy limitados. Son peces que habitan los arroyos y pequeños lagos de agua dulce de las zonas montañosas del sur de México y Centroamérica; constituyendo, en las zonas más elevadas, la única ictiofauna nativa; aunque algunas especies se han adaptado a vivir en arroyos de aguas cálidas y zonas bajas (Miller, 1955; Miller, 2005). Son peces pequeños, los adultos generalmente miden entre 60 y 100 mm de longitud patrón, aunque las tallas máximas que se han encontrado en algunas especies son de 130 mm de longitud total en las hembras y 120 mm para los machos (Velázquez-Velázquez *et al.*, 2007).

Ocho de las 15 especies descritas de profundúlidos concurren solamente en México: *Tlaloc hildebrandi* (Miller, 1950), endémica de Chiapas (Velázquez-Velázquez y Schmitter-Soto, 2004; Domínguez-Cisneros *et al.*, 2017). *Profundulus mixtlanensis* (Ornelas-García *et al.*, 2015), *Profundulus parentiae* (Matamoros *et al.*, 2018), *Profundulus oaxacae* (Meek, 1902, Miller, 2005); *Profundulus chimalapensis* (Del Moral, 2020); *P. emilioi* y *P. rei* (Calixto-Rojas *et al.*, 2023), concurren en Oaxaca y *Profundulus balsanus* (Ahl, 1935; Jamangapé *et al.*, 2016), en Guerrero; además *Tlaloc candalarius* Hubbs, 1924, es una especie cuasiendémica, cuya distribución se restringe a la cuenca del río Grande de Comitán en Chiapas, México y en algunos

arroyos de la Candelaria en la frontera con Guatemala (Miller, 1955, 2005). En Centroamérica se han registrado tres especies, *Profundulus guatemalensis* (Günther, 1866, Lyons & Barraza, 2020). *Profundulus kreiseri* (Matamoros *et al.*, 2012), y *Tlaloc portillorum* endémica de Honduras (Matamoros y Schaefer, 2010; McCranie *et al.* 2018). Finalmente, dos especies son de amplia distribución en el sur de México y Centroamérica: *P. punctatus* y *T. labialis* (Günther, 1866, Miller, 2005).

La taxonomía de los peces profundúlidos ha sido relativamente cambiante en los últimos dos siglos. Günther (1866) describió a las primeras especies asignadas al género *Fundulus* (*Fundulus punctatus*, *F. labialis*, *F. guatemalensis* y *F. pachycephalus*). Hubbs (1924) erigió el género *Profundulus* (familia Cyprinodontidae), y fue diagnosticado sobre la base de caracteres merísticos y morfológicos (Hubbs, 1924; Miller, 1955); adicionalmente Uyeno y Miller (1962) describieron algunos caracteres osteológicos del género. Hubbs (1924) y Parenti (1981) propusieron a *Profundulus* como el más ancestral (plesiomórfico) de los Cyprinodontoides.

La familia Profundulidae fue erigida por Hoedeman y Bronner en 1951, la cual incluía un solo género nominal *Profundulus* (Hubbs, 1924). En la revisión de Parenti (1981) del orden Cyprinodontiformes, con base en el uso de métodos de sistemática filogenética y biogeografía cladista (utilizando principalmente caracteres osteológicos), diagnosticó (con base en caracteres osteológicos) a la familia Profundulidae. Costa (1998), en su trabajo sobre la filogenia y clasificación de los Cyprinodontiformes (utilizando 124 caracteres, principalmente osteológicos) reconoce a Profundulidae como un grupo natural y describe los caracteres diagnósticos de la familia: *Cartílago rostral y ligamentos bien desarrollados; de 13 a 23 branquiaspinas sobre la rama anterior del primer arco branquial, vómer en forma Y; un proceso estrecho sobre la porción anterior del etmoides lateral; y apertura anterior de las narinas situada en una estructura carnosa prominente.*

Según Parenti (1981) y Miller (1955, 2005) la taxonomía de la familia Profundulidae estaba compuesta por un solo género (*Profundulus*), que se dividía en dos subgéneros o grupos: a) el grupo *Punctatus* o subgénero *Profundulus* con tres especies válidas -*Profundulus punctatus*, *P. guatemalensis* y *P. oaxacae*-, y b) el grupo *Labialis* o subgénero *Tlaloc* con tres especies -*Profundulus labialis*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi*. González-Díaz *et al.* (2014), realizó la comparación osteológica de las especies de los dos subgéneros, encontrando evidencia para suponer que ambos taxones podrían ser reubicados como géneros.

Recientemente, Morcillo *et al.* (2016) basados en evidencia molecular, realizaron el primer trabajo sobre las relaciones filogenéticas e historia evolutiva de la familia Profundulidae; como resultado los dos subgéneros fueron elevados a nivel de género con una divergencia molecular de 24.5%. Las diferencias morfológicas entre los géneros fueron atribuidas a la presencia o ausencia de una mancha humeral en la base de la aleta pectoral y por el número de escamas en la región preorbital y base de la aleta caudal (Miller, 1955); así como a estructuras osteológicas de los dos subgéneros (González-Díaz *et al.*, 2014).

Además, Morcillo *et al.* (2016) propusieron una filogenia molecular con dos hipótesis de diversidad taxonómica dentro de la familia: un modelo conservador de ocho especies y un modelo de mayor diversidad con 12 especies. Ambos modelos proporcionaron evidencias adicionales de una mayor diversidad taxonómica que la originalmente reconocida en esta familia y la importancia de realizar más estudios para resolver la taxonomía de los géneros, particularmente en el género *Profundulus*.

Los peces de la familia Profundulidae han sido objeto de reciente interés, debido a que éstos son muy interesantes desde el punto de vista biológico y taxonómico, siendo además, una de las pocas familias de peces dulceacuícolas endémicas a Mesoamérica (Morcillo *et al.*, 2016); varias de sus especies poseen rangos de distribución muy restringidos y son un grupo modelo para

estudios biogeográficos y evolutivos, adicionalmente varias especies presentan problemas de conservación (Velázquez *et al.*, 2008; Morcillo *et al.*, 2016; Lyons y Matamoros, 2020).

Los patrones biogeográficos actuales de la familia Profundulidae, han sido atribuidos como consecuencia de la actividad volcánica de la región, ocurrida en el Mioceno inferior, seguida por eventos más recientes durante el Cuaternario, que coincidieron con fluctuaciones climáticas en el Pleistoceno (Morcillo *et al.*, 2016). La familia Profundulidae se originó durante el Oligoceno Superior (Morcillo *et al.*, 2016, Calixto-Rojas *et al.*, 2021), en el cual ocurrieron dos grandes pulsos de diversificación dentro de la familia, lo cual coincide con eventos de diversificación en otros grupos de peces (Morcillo *et al.*, 2016).

La dificultad en el establecimiento de límites entre las especies en Profundulidae, principalmente en el género *Profundulus*, es un reflejo de la compleja historia geológica de Centroamérica, principalmente en la zona del Istmo de Tehuantepec (Miller, 1955; Morcillo *et al.*, 2016).

Parte de la problemática taxonómica de la familia se debe a la similitud de tipo morfológico que presentan las especies, lo que ha permitido la identificación de linajes genéticos independientes y especies crípticas que estaban enmascaradas debido a la poca variabilidad morfológica externa, particularmente dentro del género *Profundulus*.

Los datos moleculares apoyan la monofilia de la familia Profundulidae y dan un buen soporte molecular para el reconocimiento de los dos géneros que la integran, los cuales no han sido diagnosticados incluyendo a todas las especies descritas actualmente, dejando clara la necesidad de realizar estudios morfológicos-osteológicos para diagnosticar y redescubrir a los géneros *Tlaloc* y *Profundulus*. Además, no existe un trabajo actualizado que sintetice la información taxonómica de las especies que conforman la familia Profundulidae; por lo que, con base en la integración de caracteres morfológicos y osteológicos, se realizó una clave dicotómica para la identificación de las especies que integran la familia Profundulidae. Así mismo se actualiza la

filogenia de la familia con base en datos moleculares, incorporando las especies recientemente descritas y posibles nuevas especies. Lo anterior aporta evidencia de apoyo para determinar los límites taxonómicos entre los dos géneros y sus respectivas especies, y sus relaciones filogenéticas.

IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPOTESIS

¿Son útiles los caracteres osteológicos, merísticos y morfométricos tradicionales para la determinación y la delimitación de los géneros y especies de la familia Profundulidae?

¿Derivado de los análisis moleculares previos y actualizados, se encontrarán especies nuevas dentro de la familia?

¿La inclusión de todas las especies actualmente descritas en la filogenia molecular, modificará las relaciones filogenéticas establecidas con anterioridad para la familia?

4.1 Hipótesis.

1. Los caracteres morfológicos tradicionales (merísticos y morfométricos) y los caracteres osteológicos han sido utilizados dentro del orden Cyprinodontiformes como elementos útiles en las diagnósis de los géneros y especies; sin embargo, dada la similitud morfológica entre las especies de los dos géneros que integran la familia Profundulidae, se espera que los caracteres osteológicos sean de mayor utilidad (informativos) que los caracteres morfológicos tradicionales para el diagnóstico de los géneros *Tlaloc* y *Profundulus*, debido a que estos caracteres son más conservadores (de cambios más lentos).
2. Morcillo *et al.* (2016), propusieron una hipótesis taxonómica con dos modelos basados en datos moleculares: un modelo conservador de ocho especies y un modelo de 12 especies. Ambos modelos proporcionaron evidencias adicionales de una mayor diversidad taxonómica que la originalmente reconocida en esta familia, y apuntan a la importancia de realizar más estudios moleculares para resolver la taxonomía dentro de los géneros. Dado los descubrimientos recientes de nuevas especies (*P. parentiae*, *P. chimalapensis* y

Profundulus mixtlanensis), se espera que la filogenia actualizada de la familia Profundulidae proporcione un mayor soporte a la hipótesis de mayor diversidad de especies, particularmente dentro del género *Profundulus*.

Derivado de estas preguntas e hipótesis, se han formulado los siguientes objetivos, que se pretenden desarrollar, basadas en el análisis de la información morfológica y molecular de los peces de la familia Profundulidae:

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar y delimitar taxonómicamente con base a la integración de caracteres morfológicos los géneros de la familia Profundulidae, así como reconstruir la filogenia de la familia basada en caracteres moleculares.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Diagnosticar y redescubrir los géneros *Tlaloc* y *Profundulus* con base en caracteres morfológicos y osteológicos.

5.2.2 Describir posibles especies nuevas de la familia Profundulidae a partir de los análisis morfológicos y moleculares.

5.2.3 Actualizar la filogenia de la familia Profundulidae con base en el uso de caracteres moleculares.

VI. PLAN DE ESTUDIO

Con el propósito de evaluar y delimitar taxonómicamente los peces de la familia Profundulidae, en este trabajo de investigación se espera diagnosticar y redescibir el género *Tlaloc* y actualizar la diagnosis y descripción del género *Profundulus*, con base en el uso de caracteres morfológicos tradicionales y la incorporación de caracteres osteológicos informativos; además de la descripción de posibles nuevas especies; lo anterior nos permitirá dilucidar los límites taxonómicos entre los dos géneros y la delimitación de las especies que lo componen. Así mismo, basados en datos moleculares, se espera actualizar la filogenia de la familia Profundulidae. El documento está organizado en tres capítulos, los cuales se abordan de la siguiente manera:

Capítulo I. Diagnóstico y redescipción de los géneros *Tlaloc* y *Profundulus*. Con base en caracteres morfológicos tradicionales (merísticos, morfométricos, patrones de coloración y poros cefálicos), así como la incorporación de caracteres osteológicos, se realizó el diagnóstico y redescipción de los géneros *Tlaloc* y *Profundulus*, lo anterior basado en el análisis de las 13 especies reconocidas en su momento, que incluye la revisión de 838 ejemplares de ambos géneros y 100 ejemplares diafanizados.

Capítulo II. Descripción de una nueva especie de *Profundulus*. Como resultado de los análisis moleculares y morfológicos, se describe una nueva especie dentro del género *Profundulus*. La nueva especie -*Profundulus adani*-, se describe con ejemplares provenientes de la cuenca alta del río Papaloapán, en el municipio de Santa María Ixcatlán, Oaxaca, México.

Capítulo III. Análisis filogenético de la familia Profundulidae. Con base en el análisis de caracteres moleculares (ADNm) de 154 secuencias de las 13 especies nominales dentro de la familia Profundulidae se construyó y actualizó la filogenia de la familia.

VII. CAPÍTULO I

DIAGNÓSTICO Y REDESCRIPCIÓN DE LOS GÉNEROS *TLALOC* Y *PROFUNDULUS*.

**Redescription and diagnoses of the genera *Profundulus* and *Tlaloc*
(Cyprinodontiformes: Profundulidae), Mesoamerican endemic fishes.**

Sara E. Domínguez-Cisneros, Omar Domínguez-Domínguez, Ernesto Velázquez-Velázquez and
Rodolfo Pérez-Rodríguez

Publicado en Revista **Neotropical Ichthyology**, 20 de febrero de 2023

Redescription and diagnoses of the genera *Profundulus* and *Tlaloc* (Cyprinodontiformes: Profundulidae), Mesoamerican endemic fishes



Correspondence:
Ernesto Velázquez-Velázquez
ernestavelazquez@unicach.mx

Sara E. Domínguez-Cisneros^{1,3}, Omar Domínguez-Domínguez²,
Ernesto Velázquez-Velázquez³ and Rodolfo Pérez-Rodríguez²

Submitted September 9, 2022

Accepted December 8, 2022

by Paulo Lucinda

Epub February 20, 2023

Until recently, the genus *Profundulus* was classified in two subgenera, *Profundulus* and *Tlaloc*, the sole members of the family Profundulidae. Newly discovered molecular data have been used to justify the elevation of these subgenera to genera. Yet morphological analyses to diagnose the two genera are lacking. The aim of this study is to provide a generic diagnosis and a taxonomic key to the species within the family Profundulidae based on morphology. The genus *Tlaloc* is diagnosed on the basis of five unique characters, among which are the prominent and oval-shaped mesethmoid, exceeding the posterior margins of the vomer; the anterior portion of the parasphenoid making contact with the mesethmoid and extend beyond the center of the mesethmoid; and a reduced autopterotic fossa. *Profundulus* is diagnosed here based on the following characters: the mesethmoid is small, crescent-shaped, and does not extend beyond the margins of the vomer; the anterior portion of the parasphenoid just contacting the mesethmoid and not extending beyond the center of the mesethmoid; a large autopterotic fossa. For each genus, description and distribution ranges are provided as well as a key for identification of the species.

Keywords: Distribution, Identification key, Morphological characters, Profundulids, Taxonomy.



Online version ISSN 1982-0224

Print version ISSN 1679-6225

Neotrop. Ichthyol.
vol. 21, no. 1, Maringá 2023

¹ Doctorado en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte, 1150, Col. Lajas Maciel, 29029 Tuxtla Gutiérrez, CHIS, México. (SEDC) sara.dominguez@unicach.mx.

² Laboratorio de Biología Acuática, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio "R" planta baja, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mujica S/N, 58030 Morelia, MEX, México. (ODD) goodeido@yahoo.com.mx, (RPR) rperez38@gmail.com.

³ Colección de Peces, Museo de Zoología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte, 1150, Col. Lajas Maciel, 29029 Tuxtla Gutiérrez, CHIS, México. (EVV) ernesto.velazquez@unicach.mx (corresponding author).



Official Journal of the
Sociedade Brasileira de Ictiologia

Neotropical Ichthyology, 21(1): e220089, 2023

1/22

Hasta recientemente, el género *Profundulus* estuvo integrado por dos subgéneros, *Profundulus* y *Tlaloc*, los únicos miembros de la familia Profundulidae. Análisis moleculares recientes se han utilizado como justificación para erigir estos subgéneros a géneros; sin embargo se carecen de los análisis morfológicos que diagnostiquen a ambos géneros. El objetivo de este estudio es proporcionar las diagnósicos de los géneros y una clave taxonómica para la identificación de las especies de la familia Profundulidae, basada en la morfología. El género *Tlaloc* se diagnostica con base en cinco caracteres morfológicos únicos, entre ellos, el mesetmoides prominente y de forma oval, sus bordes exceden el margen posterior del vómer; la porción anterior del parasfenoides está en contacto con el mesetmoides y sobrepasa la parte media de este; la fosa autopterótica es reducida. *Profundulus* es diagnosticado con base en seis caracteres morfológicos únicos, entre ellos el mesetmoides pequeño, en forma de media luna, y no excede los márgenes del vómer; la porción anterior del parasfenoides, justo en contacto con el mesetmoides y no va más allá de la parte medial de este último hueso; la fosa autopterótica grande. La descripción y los rangos de distribución para cada género, así como una clave para la identificación de las especies, son provistas.

Palabras clave: Caracteres morfológicos, Clave de identificación, Distribución, Profundúlidos, Taxonomía.

INTRODUCTION

The family Profundulidae Hoedeman & Bronner, 1951 is a group of freshwater fishes with a restricted geographical distribution, extending from southern Mexico to Central America (Miller, 1955; Matamoros *et al.*, 2012). It is one of the characteristic elements of the endemic fauna of Central America and the southern Mexico highlands (Miller, 1955), with most of the included species having a restricted distribution range and occurring only in a few adjacent river systems (Matamoros *et al.*, 2012). The Profundulidae is one of the least speciose within the order Cyprinodontiformes (killifishes, pupfishes, and relatives), with only thirteen described species, compared to, for example, approximately 59 nominal species in the family Goodeidae, its sister-group (Nelson *et al.*, 2016; Piller *et al.*, 2022). The profundulids or Middle American killifishes are commonly known as escamudos (Lozano-Vilano, De La Maza-Benignos, 2016).

Until recently, the genus *Profundulus* was classified in two subgenera, *Profundulus* and *Tlaloc*, the sole members of the family Profundulidae (Miller, 1955, 2009; Parenti, 1981). Newly discovered molecular data have been used to justify the elevation of these subgenera to genera by Morcillo *et al.* (2016). In the absence of a diagnosis, the new clades were supported based on previously documented differences in both subgenera: presence or absence of a humeral spot at the base of the pectoral fin and the number of scales in the preorbital region and base of the caudal fin (Miller, 1955, 2009), as well as by a series of osteological characters of the axial and appendicular skeleton (González-Díaz *et al.*, 2014). These morphological-osteological differences were based on a review of only six species. Our knowledge of the Profundulidae is growing rapidly, and the

number of valid species has more than doubled since Miller's comprehensive revision of *Profundulus* in 1955. Five new species were described within the genus *Profundulus* and one in the genus *Tlaloc*. Additionally, *Profundulus balsanus* Ahl, 1935 was redescribed and recognized as a valid species (Jamangapé *et al.*, 2016).

External morphological traits (meristic and morphometric) were once the primary sources of characters to distinguish the subgenera and species and to classify profundulid fishes (Miller, 1955, 2009). Different types of morphological characters were gradually introduced to killifish systematics (Parenti, 1981; Costa, 2006) and the morphological analysis of bones has been an important source of morphological characters for hypothesizing relationships among profundulids and cyprinodontoid sister families (Parenti, 1981; Costa, 1998; Ghedotti, Davis, 2013) and between the subgenera and some species of the Profundulidae (*e.g.*, Uyeno, Miller, 1962; González-Díaz *et al.*, 2014).

Profundulids are among the least studied Cyprinodontiformes, and the systematics of the family is still in its early stages, with genera and some species poorly defined, and few descriptions of their osteology (Lozano-Vilano, De La Maza-Benignos, 2016; Morcillo *et al.*, 2016). Several recent molecular studies provide hypotheses on the relationship of profundulid taxa and confirm the monophyly of two previously proposed genera (or subgenera) (*e.g.*, Doadrio *et al.*, 1999; Morcillo *et al.*, 2016; Calixto-Rojas *et al.*, 2021). Molecular data support profundulid clades (genera) which have been scarcely described by morphological characters, highlighting the need to improve the osteological-morphological database for this group. Therefore, the aim of this study is to provide accurate descriptions of morphological characters, including external morphology of body, osteology, neuromasts (cephalic pores), and contact organs in *Profundulus* and *Tlaloc*, and to discover additional informative characters to diagnose and characterize both genera. A dichotomous key for the identification of the species of the family Profundulidae is presented.

MATERIAL AND METHODS

The examined material is deposited in the fish collection of the Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca (CIDOAX); Colección Nacional de Peces, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico (CNPE-IBUNAM); Field Museum of Natural History, Chicago (FMNH); Louisiana Museum of Natural Science, Louisiana (LSUMZ or LSU MNS); Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Mexico (MZ-UNICACH). The list of the examined material includes the acronym of the collection and the catalog number, followed by the number of specimens, in parentheses the specimens cleared and stained (c&s), and by their standard-length range.

Measurements and counts follow Miller (1955) and are presented as percentages of standard length (SL), except for those relative to head morphology, which are expressed as percentages of head length (HL). Seventeen morphometric measurements (in mm) and nine meristic variables were recorded from species of the genera *Tlaloc* and *Profundulus*.

Morphometric (Fig. 1): 1, standard length (SL); 2, head length (HL); 3, predorsal length (PL); 4, prepelvic length (PPL); 5, anal origin to caudal base (AOCB); 6, body, greatest depth (BGD); 7, body, greatest width (BGW); 8, caudal peduncle, length (CPL); 9, caudal peduncle, least depth (CPLD); 10, dorsal fin, basal length (DFBL); 11, anal fin, basal length (AFBL); 12, head depth (HD); 13, head width (HW); 14, interorbital, least bony width (IOLBW); 15, orbit length (OL); 16, snout length (SNL); 17, upper jaw length (UJL).

Meristic: 1, dorsal-fin rays; 2, anal-fin rays; 3, caudal-fin rays; 4, pectoral-fin rays; 5, pelvic-fin rays; 6, scales in lateral series; 7, predorsal scales; 8, scales count around the body; 9, scales count around peduncle. The number, morphology, and arrangement of sensorial pores in the cephalic region were studied and named following the methods and terminology of Gosline (1949) and Miller (1955).

Osteological characters were obtained from specimens of the 13 profundulid species, cleared and double stained (bone alizarin and cartilage counter-stained with alcian blue), according to the technique described by Taylor (1967), with some modifications proposed by Taylor, Van Dyke (1985). The identification of bone elements was based on the bone nomenclature proposed by Gosline (1961), Parenti (1981), and Costa (1998). The terminology of fin rays and the count of vertebrae follows Arratia (2008) and Schultze, Arratia (2013). Based on the variation in meristic, morphometric, and osteological characters as well as the distribution of the species, a dichotomous key for the identification of the species of the family Profundulidae was established.

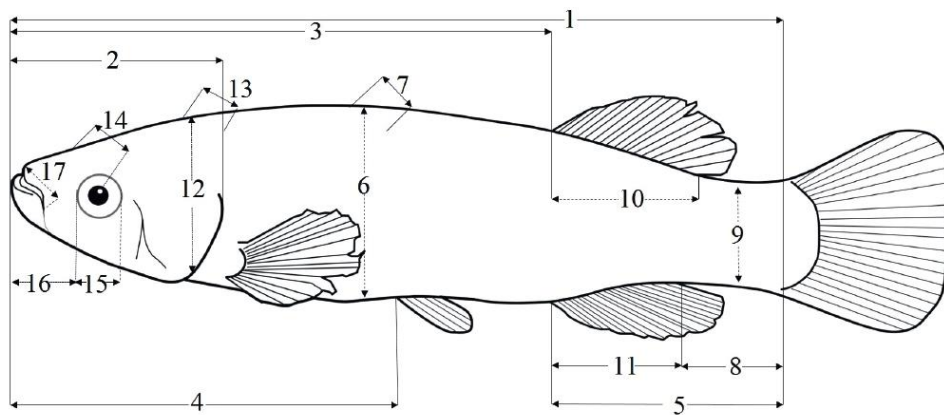


FIGURE 1 | Morphometric characters, based on sketches of *Profundulus* in lateral view. Morphometric measurements in the Material and Methods section.

RESULTS

Four species are recognized in the genus *Tlaloc* (Morcillo *et al.*, 2016; Lozano-Vilano, De La Maza-Benignos, 2016): *T. labialis* (Günther, 1866), *T. candaliarius* (Hubbs, 1924), *T. hildebrandi* (Miller, 1950), and *T. portillorum* (Matamoros & Schaefer, 2010).

Tlaloc Álvarez & Carranza, 1951

Tlaloc Álvarez, Carranza, 1951:40 (type species *Fundulus labialis* Günther, 1866, by monotype).

Diagnosis. *Tlaloc*, one of the two genera of the family Profundulidae, is diagnosed here by the following combination of characters: The mesethmoid is prominent and oval in shape, extending beyond the posterior margins of the vomer, encompassing the posterior medial extension and touching the lateral ethmoids (Fig. 2B). The anterior portion of the parasphenoid making contact with the mesethmoid and extend beyond the center of the mesethmoid. The autopterotic fossa is reduced (Fig. 2A). The dorsal margin of the interoperculum, with a long extension, is exceeding the edge of the bone (Fig. 3A). The ventral margin of the lacrimal is straight (Figs. 4A–B). *Tlaloc* is further distinguished from *Profundulus* by having less than the basal half of the caudal fin densely scaled (except in *T. portillorum*) (*vs.* more than the basal half or more densely scaled) (Fig. 5A); by the absence of a humeral spot (*vs.* humeral spot present); by the origin of the dorsal fin positioned at a vertical line posterior to the origin of the anal fin (*vs.* origin of the dorsal fin positioned at a vertical line slightly anterior to the origin of the anal fin); by long epiotic processes, extending beyond the second vertebra (*vs.* short epiotic processes, not extending beyond the first vertebra).

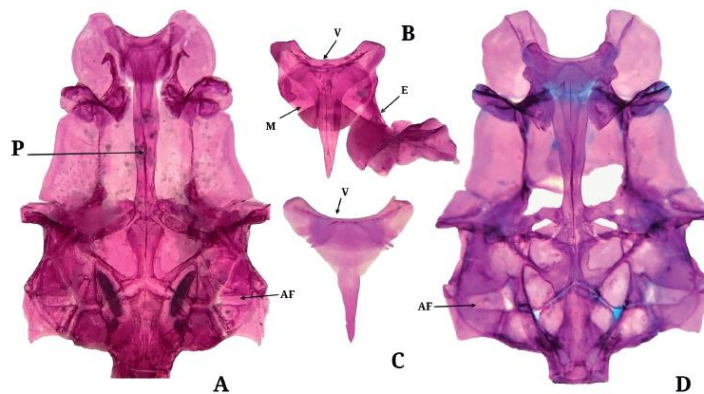


FIGURE 2 | Ventral view of the neurocranium, in specimens cleared and stained. **A.** *Tlaloc portillorum* (MZ-UNICACH 7222, 70.5 mm SL); **B.** Vomer region of *T. candaliarius* (MZ-UNICACH 3899, 61.7 mm SL); **C.** Vomer region of *Profundulus kreiseri* (MZ-UNICACH 7214, 59.6 mm SL); and **D.** Neurocranium of *P. mixtlanensis* (MZ-UNICACH 6716, 55.6 mm SL). Abbreviations: V, vomer (Y-shaped); E, lateral ethmoid; M, mesethmoid; P, parasphenoid; AF, autopterotic fossa.

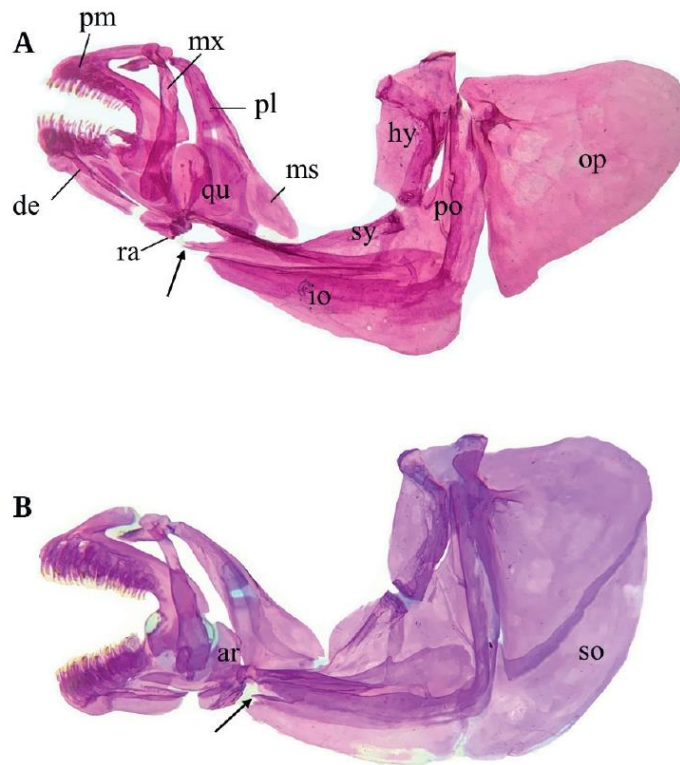


FIGURE 3 | Lateral view of left jaws, suspensorium and opercular series in specimens cleared and stained. **A.** *Tilaloc portillorum* (MZ-UNICACH 7222, 70.5 mm SL); **B.** *Profundulus mixtlanensis* (MZ-UNICACH 6716, 55.6 mm SL). Arrow points to dorsal margin of the interopercle, with a long or short extension. Abbreviations: de, dentary; pm, premaxilla; ra, retroarticular; mx, maxilla; pl, palatine; qu, quadrate; ar, articular; ms, mesopterygoid; io, interopercle; sy, symplectic; hy, hyomandibula; po, preopercle; op, opercle; so, subopercle.

Description. Morphometric data appear in Tab. 1. Body uniformly slender; head compressed, moderately large (22.4–36.7%). Mouth subterminal to terminal. In *T. hildebrandi* and *T. portillorum*, the lower jaw broad, heavy, and protruding so that the upper jaw is included, whereas in *T. labialis* and *T. candalarius* both equal in forward projection, or the lower jaw is included in the upper jaw. Greatest body depth in the vertical just posterior to pectoral fin (20.0–32.6%). The females are elongated, and the males are more robust than the females. Dorsal and anal fins located posterior to the half of body length. Caudal peduncle relatively large (16.2–26.4%). Median hypural plate divided into subequal parts by an open groove.

TABLE 1 | Morphometric data of *Tlaloc* and *Profundulus* species. Asterisk mark the number of specimens analyzed, in parenthesis the average values.

| | <i>Tlaloc portillorum</i> 58* | <i>T. hildebrandi</i> 63* | <i>T. labialis</i> 58* | <i>T. candalarius</i> 100* | <i>Profundulus punctatus</i> 196* | <i>P. guatemalensis</i> 26* |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Standard length (mm) | 37.6–71.4 (50.4) | 37.9–111.5 (58.2) | 33.4–101.9 (53.1) | 38.8–99.2 (51.6) | 36.2–82.2 (50.3) | 38.4–83.9 (51.8) |
| Percents of standard length | | | | | | |
| Head length | 25.7–32.0 (28.9) | 26.8–32.2 (28.3) | 22.4–31.6 (26.9) | 26.3–36.7 (29.4) | 26.1–32.6 (29.1) | 27.0–31.1 (28.9) |
| Predorsal length | 66.1–73.6 (69.6) | 64.2–68.5 (66.3) | 65.0–70.4 (67.4) | 63.6–73.8 (69.7) | 62.2–74.7(68.0) | 65.5–71.5 (68.4) |
| Prepelvic length | 47.7–55.2 (51.1) | 45.8–51.8 (48.9) | 46.8–54.7 (50.6) | 48.9–61.1 (53.7) | 47.0–57.6 (52.2) | 49.8–53.6 (51.5) |
| Anal origin to caudal base | 29.0–36.7 (33.4) | 36.3–41.9 (39.1) | 32.3–41.8 (36.1) | 27.3–39.7 (33.3) | 19.3–37.4 (33.2) | 31.9–36.7 (34.5) |
| Body, greatest depth | 20.0–27.8 (25.2) | 22.1–29.7 (24.6) | 20.2–29.9 (24.4) | 20.7–32.6 (27.7) | 21.0–33.6 (28.5) | 25.7–31.5 (29.0) |
| Body, greatest width | 11.8–17.0 (14.5) | 12.5–17.6 (14.8) | 10.6–18.1 (14.3) | 11.5–19.5 (15.6) | 14.3–22.8 (18.3) | 10.8–18.2 (14.7) |
| Caudal peduncle, length | 16.3–23.5 (19.8) | 20.3–26.4 (23.3) | 17.8–23.6 (21.5) | 16.2–24.0 (19.5) | 13.7–21.8 (18.3) | 15.5–22.1 (18.8) |
| Caudal peduncle, Least depth | 12.6–15.9 (14.3) | 12.0–15.1 (13.4) | 12.6–15.1 (13.5) | 11.4–16.6 (13.5) | 13.9–18.3 (15.7) | 14.2–16.1 (15.2) |
| Dorsal fin, basal length | 11.1–16.5 (14.1) | 11.7–17.6 (14.1) | 11.6–16.4 (14.0) | 11.1–17.7 (13.9) | 11.1–18.3 (15.0) | 12.5–16.6 (14.7) |
| Anal fin, basal length | 12.1–17.4 (14.3) | 14.0–19.1 (16.0) | 12.7–19.5 (15.5) | 12.3–17.5 (14.5) | 11.6–20.1 (15.7) | 14.3–18.6 (16.0) |
| Percents of head length | | | | | | |
| Head depth | 55.6–98.0 (67.3) | 53.3–85.4 (62.5) | 57.5–76.2 (67.0) | 56.6–100.1 (68.5) | 56.5–94.9 (72.7) | 64.8–101.7 (86.0) |
| Head width | 49.3–72.9 (59.6) | 49.2–71.0 (64.6) | 54.8–70.6 (62.1) | 49.2–70.0 (60.7) | 58.8–80.6 (68.7) | 55.8–75.8 (64.3) |
| Interorbital, least bony width | 37.3–48.7 (42.1) | 40.0–48.7 (45.2) | 41.1–51.7 (46.2) | 34.9–48.3 (42.9) | 40.0–53.2 (47.2) | 43.3–54.1 (47.3) |
| Orbit length | 21.1–28.6 (24.5) | 18.0–28.9 (24.8) | 24.9–32.7 (28.6) | 19.5–30.6 (26.5) | 19.0–29.9 (25.4) | 21.6–29.2 (24.0) |
| Snout length | 28.8–35.6 (32.7) | 29.8–39.7 (34.9) | 29.3–39.7 (33.7) | 27.5–38.3 (32.8) | 25.6–37.4 (32.3) | 28.6–36.9 (33.3) |
| Upper jaw length | 23.9–32.9 (28.3) | 26.3–35.3 (31.0) | 22.1–31.4 (27.6) | 21.5–32.3 (27.7) | 16.9–31.7 (25.3) | 20.7–33.2(29.6.3) |



TABLE 1 | (Continued)

| | <i>P. oaxacae</i> 28* | <i>P. balsanus</i> 22* | <i>P. kreiseri</i> 52* | <i>P. parentiae</i> 40* | <i>P. mixtlanensis</i> 59* | <i>P. adani</i> 73* | <i>p. chimalapensis</i> 38* |
|------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Standard length (mm) | 35.0–63.2 (45.5) | 34.2–64.7 (49.7) | 37.2–72.7 (49.4) | 36.8–73.9 (52.7) | 39.0–70.6 (49.7) | 36.7–77.9 (53.7) | 35.9–80.3 (45.6) |
| Percents of standard length | | | | | | | |
| Head length | 26.3–30.5 (28.7) | 24.1–30.8 (26.8) | 26.2–31.6 (28.8) | 26.9–35.3 (29.4) | 26.8–35.3 (29.1) | 26.1–33.9 (28.6) | 27.4–33.4 (30.8) |
| Predorsal length | 65.5–72.2 (69.0) | 61.9–71.7 (65.5) | 64.1–69.8 (67.0) | 63.7–69.3 (66.9) | 63.9–70.5 (67.1) | 64.7–73.5 (68.2) | 66.3–77.4 (69.4) |
| Prepelvic length | 47.9–57.3 (52.2) | 48.1–55.5 (51.4) | 48.2–54.0 (51.7) | 49.2–54.4 (51.5) | 51.0–57.2 (53.8) | 49.0–57.6 (53.3) | 50.2–56.4 (53.9) |
| Anal origin to caudal base | 25.2–32.6 (29.1) | 29.2–37.1 (33.4) | 29.7–36.8 (34.0) | 29.0–37.4 (33.3) | 30.8–37.8 (34.0) | 29.4–37.9 (33.3) | 27.1–35.6 (31.2) |
| Body, greatest depth | 23.5–30.8 (26.6) | 25.2–31.0 (27.8) | 21.2–30.0 (25.7) | 26.3–33.8 (30.2) | 23.7–31.2 (26.9) | 20.4–31.0 (26.1) | 24.3–30.8 (27.5) |
| Body, greatest width | 14.4–18.6 (16.5) | 11.9–22.2 (17.4) | 10.8–18.7 (14.2) | 13.2–21.4 (17.8) | 10.6–18.6 (15.0) | 11.3–20.8 (15.1) | 15.4–19.4 (17.5) |
| Caudal peduncle, length | 11.1–19.6 (14.8) | 15.5–20.8 (17.2) | 15.5–21.7 (18.5) | 14.3–20.0 (17.9) | 17.3–23.2 (19.7) | 15.5–21.9 (18.0) | 14.2–19.9 (17.0) |
| Caudal peduncle, Least depth | 11.9–16.6 (14.4) | 11.8–15.9 (13.8) | 12.4–16.2 (14.4) | 14.1–16.9 (15.3) | 11.9–15.9 (13.7) | 11.7–15.4 (13.6) | 13.9–17.4 (15.3) |
| Dorsal fin, basal length | 12.8–17.7 (15.2) | 12.5–19.2 (15.2) | 13.3–18.1 (15.5) | 11.6–18.6 (15.0) | 11.9–17.2 (14.2) | 11.7–18.3 (14.7) | 12.5–16.5 (14.7) |
| Anal fin, basal length | 11.7–18.5 (14.7) | 13.2–21.0 (16.1) | 13.7–18.3 (15.8) | 13.2–19.0 (16.1) | 12.7–18.9 (15.3) | 13.5–19.4 (16.2) | 12.6–18.9 (15.2) |
| Percents of head length | | | | | | | |
| Head depth | 66.4–101.5 (81.0) | 56.1–80.6 (69.3) | 60.1–90.7 (75.0) | 58.3–83.3 (70.5) | 59.7–82.9 (73.2) | 59.0–80.2 (71.9) | 59.9–70.5 (65.8) |
| Head width | 60.1–72.3 (65.0) | 57.9–75.5 (68.1) | 44.5–70.8 (60.9) | 53.8–77.6 (68.5) | 52.9–72.2 (65.7) | 54.8–97.5 (67.6) | 61.0–71.7 (65.6) |
| Interorbital, least bony width | 41.5–48.3 (44.3) | 38.7–55.9 (50.3) | 38.1–48.5 (44.1) | 38.9–58.7 (50.2) | 38.2–52.7 (45.1) | 38.9–50.2 (46.0) | 45.9–52.7 (48.7) |
| Orbit length | 21.2–26.3 (23.8) | 21.4–28.9 (25.0) | 20.4–31.3 (25.2) | 21.5–28.9 (25.4) | 23.1–30.0 (26.3) | 20.5–28.5 (23.6) | 22.0–32.6 (28.0) |
| Snout length | 24.0–32.2 (28.8) | 15.4–34.9 (25.3) | 27.2–38.5 (32.5) | 22.2–34.2 (29.2) | 27.3–37.8 (32.6) | 26.6–38.2 (33.5) | 28.7–37.9 (33.1) |
| Upper jaw length | 21.8–36.1 (26.9) | 11.1–23.9 (16.5) | 24.3–34.4 (28.7) | 11.2–30.0 (18.4) | 24.3–35.9 (29.7) | 21.1–36.6 (33.5) | 23.5–32.0 (26.4) |

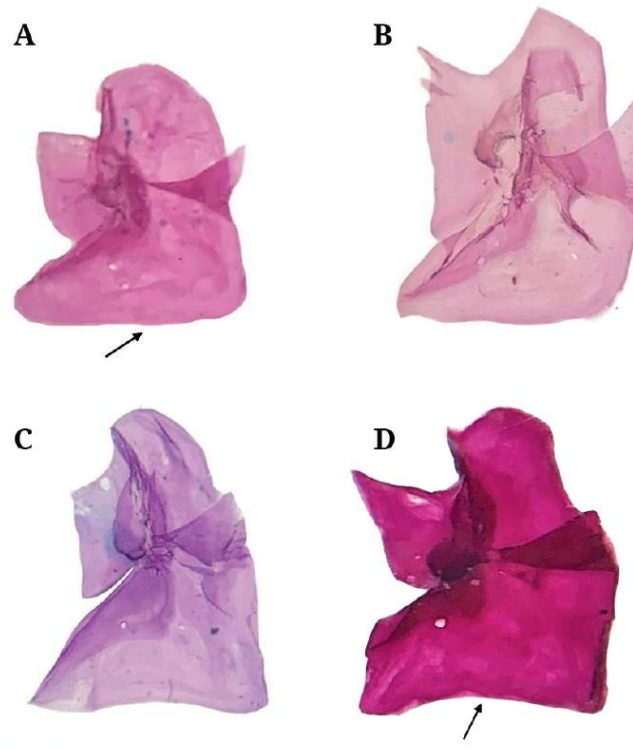


FIGURE 4 | Ventral view of left lacrimal. A. *Tlaloc portillorum* (MZ-UNICACH 7222, 70.5 mm SL); B. *T. hildebrandi* (MZ-UNICACH 2266, 75.1 mm SL); C. *Profundulus mixtlanensis* (MZ-UNICACH 6716, 55.6 mm SL); and D. *P. punctatus* (MZ-UNICACH 6632, 67.3 mm SL). Arrow point to ventral margin of the lacrimal.

The branching pattern of the cephalic latero-sensory canals in *Tlaloc* is similar to the general pattern of the Cyprinodontiformes. The supraorbital series follows the Type II designation of Gosline (1949), with canals between pores 1–2a, 2b–4a, 4b–7; preopercular pores 6–7 (mode = 7); preorbital pores 3–5 (mode = 4); mandibular pores 4–5 (mode = 5); in addition, there are 2 to 4 rostral pores usually developed.

Meristic characters are as follows (Tab. 2): anal: 9–18; dorsal: 7–14; pelvic: 5–7; pectoral: 13–20; caudal: 16–23; vertebrae totals: 33–38; gill rakers on anterior arm of the first arch: 13–19; branchiostegal rays: 6; scales lateral series: 29–39; scales predorsal: 19–26; scales around body: 25–36; scales around peduncle: 16–28.

Coloration. The coloration varies strongly among individuals and ontogenetically. The skin of the head and body may show golden reflections, especially in the opercular region and mid flank. The form and coloration of the nuptial adult male and female are shown in Fig. 6. Unpaired fins (dorsal and anal) are orange in males, with irregular black markings on the dorsal fin, evident in *Tlaloc candalarius*.

TABLE 2 | Meristic data of *Tilac* and *Profundulus* species. Asterisk mark the number of specimens analyzed, in parenthesis the modal values.

| Character | <i>T. labialis</i> 58* | <i>T. candalarius</i> 102* | <i>T. hildebrandi</i> 63* | <i>T. portillorum</i> 58* | <i>P. punctatus</i> 202* | <i>P. guatemalensis</i> 26* |
|------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Dorsal rays | 10–14 | 9–14 (11) | 10–14 (11) | 7–14 (11) | 10–14 (12) | 11–13 (12) |
| Anal rays | 13–18 (16) | 11–16 (14) | 11–16 (15) | 9–14 (13) | 11–16 (14) | 12–15 (14) |
| Pectoral rays | 16–20 (18) | 14–19 (15) | 15–18 (16) | 13–17 (15) | 14–19 (17) | 16–18 (17) |
| Caudal rays | 20–23 (20) | 16–23 (20) | 17–23 (22) | 17–23 (20) | 18–24 (21) | 18–24 (21) |
| Pelvic rays | 5–7 (6) | 5–7 (6) | 5–7 (6) | 5–7 (6) | 5–7 (6) | 6–7 (6) |
| Lateral scales | 33–39 (37) | 30–39 (34) | 33–37 (36) | 29–34 (33) | 29–34 (33) | 30–33 (33) |
| Scales predorsal | 21–26 | 19–26 (23) | 20–24 (22) | 21–26 (23) | 18–24 (20) | 20–23 (22) |
| Scales around body | 28–36 | 25–35 (31) | 27–33 (30) | 25–31 (28) | 24–30 (26) | 26–29 (28) |
| Scales around peduncle | 18–22 (21) | 16–21 (18) | 16–21 (18) | 16–22 (19) | 17–25 (20) | 18–23 (19) |
| Vertebrae | 37–38 (37) | 33–36 (35) | 36–37 (36) | 33–34 (33) | 32–34 | 32–33 (33) |
| Gill rakers | 13–18 (16) | 14–19 (17) | 14–19 (16) | 13–17 (15) | 15–21 (17) | 15–19 (17) |

TABLE 2 | (continued)

| Character | <i>P. oaxacae</i> 35* | <i>P. balsanus</i> 22* | <i>P. kreiseri</i> 50* | <i>P. parentiae</i> 41* | <i>P. mixtlanensis</i> 60* | <i>P. adani</i> 71* | <i>P. chimalapensis</i> 38* |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Dorsal rays | 11–13 (12) | 11–13 (12) | 10–14 (12) | 10–13 (12) | 10–13 (11) | 10–12 (11) | 11–14 (13) |
| Anal rays | 13–15 (14) | 15–16 (15) | 12–16 (14) | 13–16 (15) | 13–16 (14) | 13–16 (14) | 14–16 (15) |
| Pectoral rays | 15–18 (16) | 15–17 (16) | 14–17 (16) | 15–17 (16) | 15–18 (16) | 15–18 (16) | 15–18 (17) |
| Caudal rays | 17–22 (20) | 18–20 (20) | 19–23 (21) | 18–22 (20) | 18–3 (21) | 18–23 (20) | 18–23 (20) |
| Pelvic rays | 6 (6) | 6 (6) | 5–6 (6) | 6–7 (6) | 6 (6) | 6–7 (6) | 6 (6) |
| Lateral scales | 29–31 (30) | 33 (33) | 32–35 (34) | 31–33 (33) | 31–34 (33) | 32–35 (33) | 29–32 (31) |
| Scales predorsal | 22–29 (25) | 21–24 (24) | 18–23 (21) | 18–22 (22) | 21–25 (22) | 23–28 (26) | 18–21 (19) |
| Scales around body | 23–31 (27) | 26–29 (28) | 23–30 (27) | 25–29 (29) | 26–34 (28) | 25–35 (30) | 25–30 |
| Scales around peduncle | 16–22 (19) | 18–21 (19) | 17–21 (19) | 17–21 (19) | 16–21 (17) | 15–18 (17) | 17–21 (20) |
| Vertebrae | 31–33 | 33–34 (33) | 33–34 (34) | 31–32 (32) | 33–34 (33) | 33–34 (33) | 33 |
| Gill rakers | 15–18 (16) | 14–18 (15) | 14–17 (16) | 14–22 (18) | 16–19 (18) | 16–20 (17) | 16–19 (18) |



FIGURE 5 | Male general morphology and caudal fin squamation, life colour patterns in: **A.** *Tlaloc labialis*; and **B.** *Profundulus punctatus*. Solid arrow points to the squamation of the caudal fin, dashed arrow points to the humeral spot.

Sexual dimorphism and contact organs. There is little sexual dimorphism in species of the genus *Tlaloc*. Males are slightly larger than females; the largest specimen recorded was a male from *Tlaloc hildebrandi* (111.49 mm SL), whereas the maximum size recorded in a female was in *Tlaloc labialis* (101.93 mm SL). The shape of the anal fin, however, shows a marked sexual difference: the anterior anal rays of the male are not greatly longer than the posterior ones, giving the distal margin of the fin an evenly rounded edge. However, in the female, since the medial rays, from about the sixth to the tenth, are much longer than either the anterior or the posterior rays, the distal margin of the fin is lobate when expanded. Males have contact organs or spinules, articulated with the lateral surfaces of the anal fin rays with some of them conspicuously long; this is the most notable, though not striking difference between males and females of all *Tlaloc* species (Fig. 7).

Geographical distribution. Restricted to the Atlantic slope of Middle America (Fig. 8). From the border between Oaxaca and Chiapas, Mexico, to the center of Honduras, with the exception of *Tlaloc portillorum*, this is located on both slopes of Honduras, Atlantic and Pacific.

Etymology. *Tlaloc* in reference to Tlaloc, a deity of water in Aztec mythology (Álvarez, Carranza, 1951).

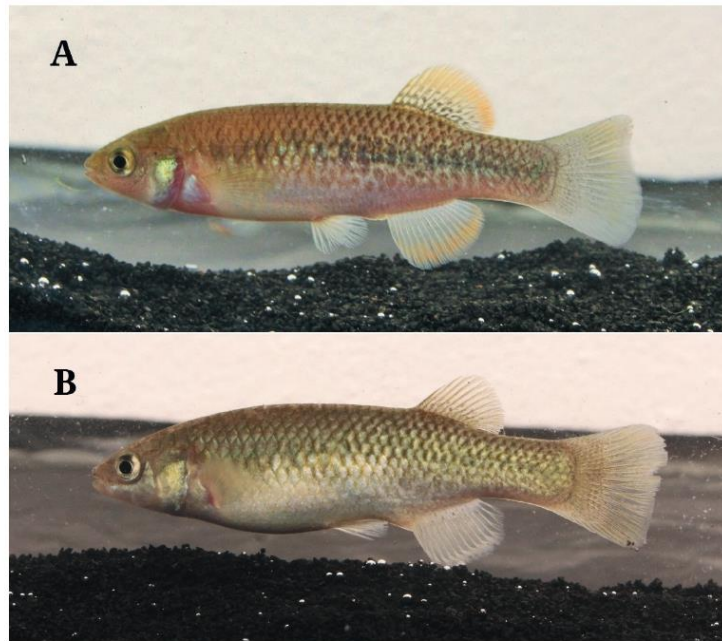


FIGURE 6 | *Tlaloc candalarius*. A. Male (MZ-UNICACH 7567, 71.4 mm SL); B. Female (MZ-UNICACH 7567, 78.8 mm SL); note the orange coloration of the dorsal and anal fins in the male.

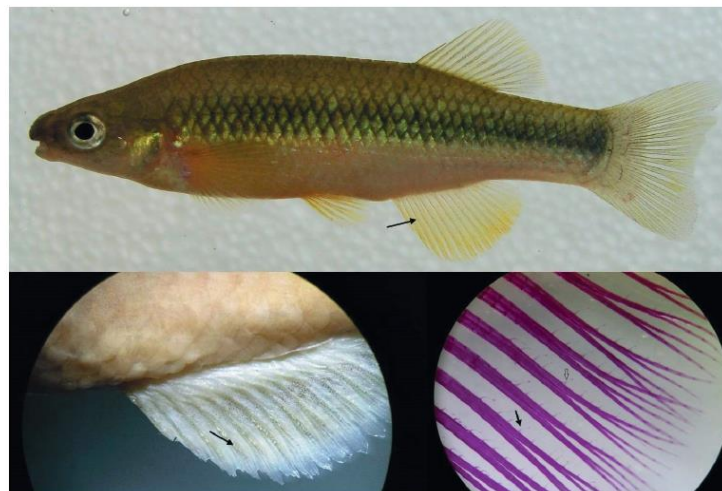


FIGURE 7 | Bony spinules in fin rays of male *Tlaloc labialis*, indicated by arrow (MZ-UNICACH 6740, 75.7 mm SL), articulated with the lateral surfaces of the anal fin rays.

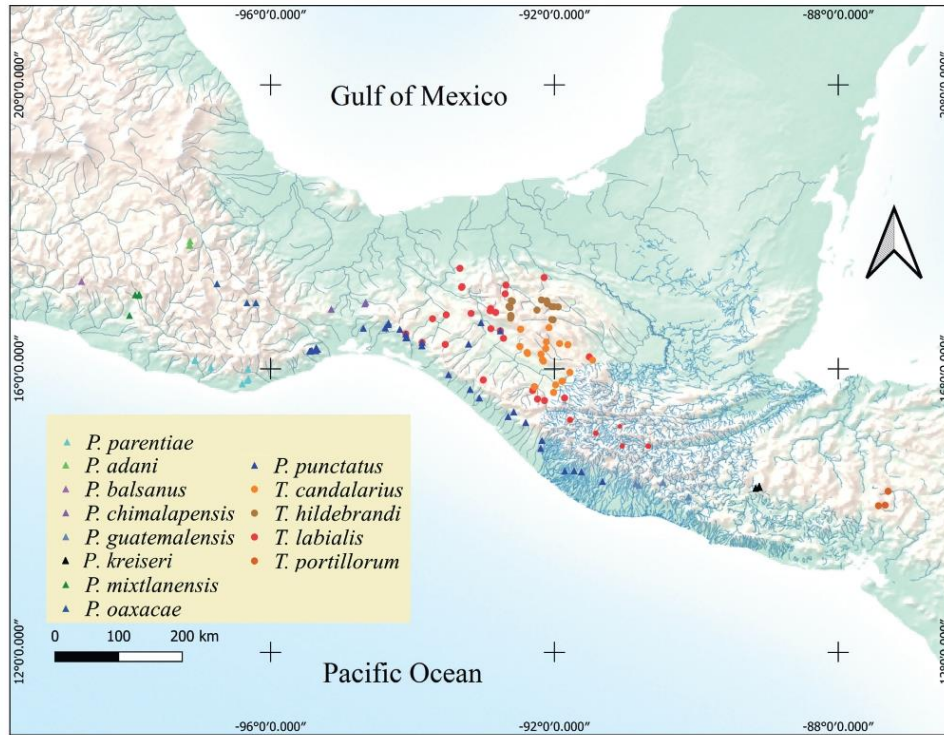


FIGURE 8 | Geographical distribution of species of the genera *Tlaloc* and *Profundulus* in southern Mexico and Central America.

Nine species are recognized in the genus *Profundulus* (Morcillo *et al.*, 2016; Del Moral-Flores *et al.*, 2020; Domínguez-Cisneros *et al.*, 2021): *P. punctatus* (Günther, 1866), *P. guatemalensis* (Günther, 1866), *P. oaxacae* (Meek, 1902), *P. balsanus*, *P. kreiseri* Matamoros, Schaefer, Hernández & Chakrabarty, 2012, *P. mixtlanensis* Ornelas-García, Martínez-Ramírez & Doadrio, 2015, *P. parentiae* Matamoros, Domínguez-Cisneros, Velázquez-Velázquez & McMahan, 2018, *P. chimalapensis* Del Moral-Flores, López-Segovia & Hernández-Arellano, 2020, and *P. adani* Domínguez-Cisneros, Velázquez-Velázquez, McMahan & Matamoros, 2021.

Profundulus Hubbs, 1924

Profundulus Hubbs, 1924:12 (type species *Fundulus punctatus* Günther, 1866, by original designation).

Diagnosis. *Profundulus* is diagnosed here based on the following characters: The mesethmoid is small, crescent-shaped, and does not extend beyond the margin of the vomer (Figs. 2C–D); the vomer is greatly broadened anteriorly, lacks lateral processes

and is in contact with the lateral ethmoids; the anterior portion of the parasphenoid is just in contact with the mesethmoid and does not extend beyond the center of the mesethmoid; the autopterotic fossa is large (Fig. 2D); the dorsal margin of the interoperculum, with a short extension, does not exceed the edge of the bone (Fig. 3B); the ventral margin of the lacrimal slightly concave (Figs. 4C–D). *Profundulus* is further distinguished from *Tlaloc* in having more than the basal half of the caudal fin densely scaled (except in *P. kreiseri*) (*vs.* less than the basal half of caudal fin densely scaled) (Fig. 5B); by a humeral spot (except in *P. adani*) (*vs.* humeral spot absent) (Fig. 5B); by the origin of the dorsal fin positioned at a vertical line slightly anterior to the origin of the anal fin (*vs.* origin of the dorsal fin positioned at a vertical line posterior to the origin of the anal fin); by short epiotic processes, not extending beyond the first vertebra (except in *P. parentiae*) (*vs.* long epiotic processes, extending beyond the second vertebra).

Description. Morphometric data appear in Tab. 2. Body rather robust, elongate; head compressed, large (24.1–35.3%); the interorbital broad (38.2–58.7%) and typically concave or nearly flat. Ascending premaxillary process short and broad and bluntly rounded at the tip. Mouth subterminal, lower jaw broad, heavy and protruding so that upper jaw is included. Dorsal fin rounded in both males and females with its basal length short (11.1–19.2%). Anal fins of males rounded, slightly elongated in females. Caudal peduncle relatively short (11.1–23.2%). Median hypural plate divided into subequal parts by an open groove.

Lateral-line system of sensory canals and pores on the head of *Profundulus*: The supraorbital series follows the Type II designation of Gosline (1949), with canals between pores 1–2a, 2b–4a, 4b–7; preopercular pores 6–8 (mode = 7); preorbital pores 3–5 (mode = 4); mandibular pores 4–5 (mode = 5); generally, there is a lack of rostral pores, exceptionally there may be 2 to 4 in some species.

Meristic traits are as follows (Tab. 2): anal: 11–17; dorsal: 10–15; pelvic: 5–7; pectoral: 13–19; caudal: 17–24; vertebrae totals: 31–35; gill rakers on anterior arm of the first arch: 14–22; branchiostegal rays, 6; scales lateral series: 29–35; scales predorsal: 18–29; scales around body: 23–35; scales around peduncle: 16–25.

Coloration. The form and coloration of the nuptial adult male are shown in Fig. 5B. Most of the body dark, often with irregular brown-dark spots on the scales, on the sides of the body on to the caudal fin. A golden yellow blotch covers the operculum and reaches the base of the pectoral fin.

Sexual dimorphism and contact organs. The sexual dimorphism is not very evident in species of the genus *Profundulus*. However, the males are slightly larger than females; the largest specimen recorded was a male from *P. guatemalensis* (83.9 mm SL), while the maximum size recorded in a female was in *P. adani* (77.9 mm SL). In males and females of all species of *Profundulus*, the dorsal and the anal fins have a similar morphology. Like *Tlaloc* (Fig. 7) the males of *Profundulus* have contact organs or spinules, articulated with the lateral surfaces of the anal fin rays with some of them conspicuously long; this is the most notable, though not striking difference between males and females of all *Profundulus* species.

Geographical distribution. On the Pacific slope, from the río Malinaltepec, río Papagayo basin, of Guerrero, southeastern Mexico, southward to the río Lempa in El Salvador and Honduras; on the Atlantic slope, from the upper reaches of the río Papaloapan of Oaxaca, Mexico, to the ríos Chamelecón and Ulúa in northwestern Honduras (Fig. 8).

Etymology. *Profundulus* in reference to its presumed primitive relationship to the genus *Fundulus* (Parenti, 1981).

Key to identification of *Profundulidae* species

- 1a. Humeral spot absent; dorsal fin origin posterior to a vertical through the anal fin origin; mesethmoid prominent and oval-shaped (c&s specimens), protruding from the posterior margins of the vomer (*Tlaloc*) 2
- 1b. Humeral spot present (except in *P. adani*); dorsal fin origin at or anterior to a vertical through the anal fin origin; mesethmoid small and crescent-shaped (c&s specimens), not protruding from the body of the vomer (*Profundulus*) 5
- 2a. Lower jaw broad, heavy, and protruding, so that the upper jaw is included 3
- 2b. Jaws equal, or the lower jaw is included in the upper jaw 4
- 3a. Thirty-six or 37 vertebrae in total; dark spot at the base of the caudal fin; 36 scales in lateral series (range: 33 to 37); origin of the anal fin to the base of the caudal fin relatively long (36.3–41.9% in the SL). Interior basin of the Chiapas highlands, Mexico (endemic) *T. hildebrandi*
- 3b. Thirty-three or 34 vertebrae in total; 33 scales in lateral series (range: 29 to 34); origin of the anal fin to the base of the caudal fin relatively short (29.0–36.7% in SL). Interior basin of the highlands of Honduras (endemic) *T. portillorum*
- 4a. Jaws equal; 33 to 36 vertebrae in total; dorsal fin in males with two or three series of black points; middle rays of the anal fin in females, similar in size to that of males. Interior basin, Comitán River and adjacent basins of Mexico and spring at Candelaria, Guatemala *T. candelarius*
- 4b. Upper jaw larger than the lower jaw; 37 to 38 vertebrae in total; middle rays of the anal fin in females, much more elongated than that of males. Interior basins of Chiapas, Mexico, and Guatemala *T. labialis*
- 5a. Scales on lateral line usually 30 (29–31); predorsal scales 25 (22–29); origin of the anal fin to the caudal-base, relatively short (25.2–32.6% in SL); pattern on the sides of the body with delineated, faint, vertical marks. Pacific slope, upper Verde River basin, Oaxaca, Mexico (endemic) *P. oaxacae*
- 5b. More than 30 scales on the lateral line; predorsal scales 19–24 (except in *P. adani*); origin of the anal fin to the caudal-base, relatively large (31.2–37.1% in SL) 6
- 6a. Less than basal half of caudal fin densely scaled; head width relatively narrow, its mean value is 60.9% in HL (range 44.5–70.8%). Inland basin of Honduras and Guatemala *P. kreiseri*

- 6b. Basal half or more of caudal fin densely scaled; head width relatively large, its mean value varies between 64.3 to 68.7% in HL.....7
- 7a. Predorsal scales usually 26 (23–28); pronounced snout, lower jaw strongly forward projected; relatively large upper jaw (21.1–36.6% in HL). Atlantic slope, upper Papaloapan River basin, Oaxaca, Mexico (endemic) *P. adani*
- 7b. Less than 25 predorsal scales; snout is not pronounced, lower jaw is not strongly forward projected.....8
- 8a. Long epiotic processes, surpassing the first epipleural ribs; robust and deep body (26.3–33.8% in SL). Pacific slope, Huatulco River, Oaxaca, Mexico (endemic) *P. parentiae*
- 8b. Short epiotic processes, not reaching the first epipleural ribs; slender and deep body (21–31.5% in SL (except in *P. punctatus*).....9
- 9a. Body of the adult fish with brown spots on the scales, aligned in such a way that they form a longitudinal band on the sides of the body; humeral spot evident.....10
- 9b. Body of the adult fish without brown spots on the scales on the sides of the body; humeral spot inconspicuous11
- 10a. Third neural spine of the caudal complex much thinner than the second; base of the narrow anal fin less than the length of the caudal peduncle. Pacific slope, from the Isthmus of Tehuantepec, Mexico, to Champerico, Guatemala and Atlantic slope, upper Grijalva River basin, Chiapas, Mexico..... *P. punctatus*
- 10b. Third neural spine of the caudal complex, as wide as the second; anal-base fin equal to or greater than the length of the caudal peduncle. Atlantic slope, upper basin of the Coatzacoalcos river (Chimalapas region), Oaxaca, Mexico (endemic) *P. chimalapensis*
- 11a. Head typically rectangular and more arched, its dorsal surface generally very rounded; dark band on the sides of the body extending from the vertical of the dorsal fin to the base of the caudal; 4 to 5 preorbital pores. Interior basin of Guatemala and El Salvador, Pacific slope *P. guatemalensis*
- 11b. Head conical, its dorsal surface concave to nearly flat; without dark band on the sides of the body; four preorbital pores. Interior basins of Guerrero and Oaxaca, Mexico. Pacific Slope12
- 12a. Relatively long upper jaw (24.3–35.9% in HL); 31 to 34 scales on the lateral midline. Pacific slope, upper basin of the Mixteco river, Oaxaca, Mexico (endemic) *P. mixtilanensis*
- 12b. Relatively short upper jaw (11.1–23.9% in HL); scales on the lateral midline invariably 33. Pacific slope, Papagayo river basin, Guerrero, Mexico (endemic) *P. balsanus*

Material examined. *Profundulus adani*: Mexico: CNPE-IBUNAM 23796, holotype, 64.7 mm SL, Santa Maria Ixcatlan, Oaxaca, 17°51'03"N 97°11'57.4"W, 19 Jun 2018, E. Velazquez & M. J. Anzueto. CNPE-IBUNAM 23797, paratypes, 3, 39.0–59.1 mm SL, Santa Maria Ixcatlan, Oaxaca, 17°51'03"N 97°11'57.4"W, 19 Jun 2018, E. Velazquez & M. J. Anzueto. CNPE-IBUNAM 23798, paratypes, 3, 42.7–48.5 mm SL, Arroyo Nodon, San Miguel Huatla, Oaxaca, 17°47'59"N 97°08'11.9"W, 20 Jun 2018, E. Velazquez & M. J. Anzueto.

FMNH 145002, paratypes, 3, 43.1–58.9 mm SL, Santa María Ixcatlan, Oaxaca, 17°51'03"N 97°11'57.4"W, 19 Jun 2018, E. Velázquez & M. J. Anzueto. FMNH 145003, paratypes, 3, 67.8–75.0 mm SL, Río Huatla, San Miguel Huatla, Oaxaca, 17°44'28"N 97°20'15.4"W, 20 Jun 2018, E. Velázquez & M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 7382, paratypes, 44 (3 c&s), 36.6–68.2 mm SL, Santa María Ixcatlan, Oaxaca, 17°47'57.59"N 97°08'10.40"W, 19 Jun 2018, E. Velázquez & M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 7342, paratypes, 18 (2 c&s), 38.3–60.8 mm SL, Arroyo Nodon, San Miguel Huatla, Oaxaca, 17°47'59"N 97°08'11.9"W, 20 Jun 2018, E. Velázquez & M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 7343, paratypes, 11, 52.3–77.9 mm SL, Río Huatla, San Miguel Huatla, Oaxaca, 17°44'28"N 97°20'15.4"W, 20 Jun 2018, E. Velázquez & M. J. Anzueto. *Profundulus balsanus*: **Mexico**: MZ-UNICACH 6712, topotypes, 22 (7 c&s), 34.2–64.6 mm SL, Río Malinaltepec, Guerrero, 17°13'38.03"N 98°40'6.31"W, 26 Apr 2014, M. J. Anzueto. *Profundulus chimalapensis*: **Mexico**: MZ-UNICACH 7559, 38 (7 c&s), 35.8–80.3 mm SL, Arroyo Piedra del Río el Corte, Santa María Chimalapa, Oaxaca, 20 Jan 2022, E. Velázquez & M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 7560, topotype, 1, 35.1 mm SL, Arroyo la Aurora, Santo Domingo Petapa, Oaxaca, 16°50'17.9"N 95°08'59.8"W, 17 Oct 2021, E. Velázquez & S. Domínguez. *Profundulus guatemalensis*: **Guatemala**: LSUMZ 17906, 1 c&s, 52.2 mm SL, Río las Cabezas, Sanarate, 20 Nov 2014, W. Matamoros. MZ-UNICACH 7194, 12 (4 c&s), 38.3–83.8 mm SL, Balneario el cantil, Río Cantil, Escuintla, 10 Apr 2017, W. Matamoros & A. E. Gonzalez. MZ-UNICACH 7195, 9 (2 c&s), 38.7–50.3 mm SL, Caserío las Cañas, Arroyo tributario del río Achihuate, Escuintla, 10 Apr 2017, M. Matamoros & A. E. Gonzalez. MZ-UNICACH 7197, 2, 41.6–42.0 mm SL, Puente la Concha, Arroyo la Concha, Jocotillo Villa Canales, 11 Apr 2017, M. Matamoros & A. E. Gonzalez. MZ-UNICACH 7198, 3, 39.4–57.3 mm SL, Las Cabezas, Puente de las Marias, Santa Rosa Oratoria, 11 Apr 2017, M. Matamoros & A. E. Gonzalez. *Profundulus kreiseri*: **El Salvador**: LSUMZ 15105, 2 (1 c&s), 41.57 mm SL, Quebrada Casco de la Hacienda, Parque Nacional Monte Cristo, Santa Ana, 7 Jun 2011, W. Matamoros. MZ-UNICACH 7205, 26 (3 c&s), 37.1–72.6 mm SL, Quebrada los Tecomates, tributario del río Lempa, Chalatenango, 12 Apr 2017, W. Matamoros & A. E. Gonzalez. MZ-UNICACH 7214, 22 (2 c&s), 38.6–63.3 mm SL, Río Onuapa, tributario del río Lempa, Chalatenango, 12 Apr 2017, W. Matamoros & A. E. Gonzalez. MZ-UNICACH 7231, 5, 39.1–4.19 mm SL, Desembocadura del río Negro, Perquín, 12 Apr 2017, W. Matamoros & A. E. Gonzalez. *Profundulus mixtlanensis*: **Mexico**: CIDOAX-300-F1228, 2, 39.0–41.1 mm SL, Yosondúa, Tlaxiaco, Oaxaca, 14 Jun 2014, E. Martínez. CIDOAX-301-F1229, 2, 45.6–49.2 mm SL, Ojo de Agua, Yutanicani, Oaxaca, 14 Jun 2014, E. Martínez. MZ-UNICACH 6716, 26 (9 c&s), 39.3–60.7 mm SL, Rancharía la Soledad, Río San Isidro, Putla, Oaxaca, 29 Apr 2015, M. J. Anzueto & E. Velázquez. MZ-UNICACH 6717, 3, 53.6–65.5 mm SL, Arroyo tributario del Río Atoyac, colonia Nuevo Tenochtitlan, Putla, Oaxaca, 29 Apr 2015, M. J. Anzueto & E. Velázquez. MZ-UNICACH P 6718, 4, 39.5–53.8 mm SL, Puente Tierra Azul, Putla, Oaxaca, 29 Apr 2015, M. J. Anzueto & E. Velázquez. *Profundulus oaxaca*: **Mexico**: MZ-UNICACH 6714, 27 (4 c&s), 35.0–63.1 mm SL, Río Salado, subcuenca Atoyac, Mitla, Oaxaca, 27 Apr 2015, M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 6715, 22 (2 c&s), 39.2–70.5 mm SL, Arroyo Grande tributario del Río la Hormiga, Mida, Oaxaca, 27 Apr 2015, M. J. Anzueto. *Profundulus parentiae*: **Mexico**: CNPE-IBUNAM 28804, holotype, 65.9 mm SL, Río Huatulco, Santa María Huatulco, Oaxaca, 15°50'24.56"N 96°19'48.75"W, 25 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. CNPE-IBUNAM 22805, paratypes, 3, 26.9–35.3 mm SL, Río Huatulco, Santa María Huatulco, Oaxaca, 15°50'24.56"N 96°19'48.75"W, 25 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. FMNH 131755, paratypes, 2, 26.9–35.3 mm SL, Río Huatulco, Santa María Huatulco, Oaxaca, 15°50'24.56"N 96°19'48.75"W, 25 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. MZ-UNICACH 6574, 6, 27.5–50.2 mm SL, Puente Hondura de Toro, Río Huatulco, Santa María Huatulco, Oaxaca, 21 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. MZ-UNICACH 6575, 10 (5 c&s), 50.3–68.3 mm SL, Toma de Agua, Río Huatulco, Santa María Huatulco, Oaxaca, 25 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. MZ-UNICACH 6576, paratypes, 10 (3 c&s), 40.2–67.7 mm SL, Arroyo de la calle central, colonia San Miguel Figueroa,

Pochuda, Oaxaca, 15°47'24.1"N 96°24'03.9"W, 21 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. MZ-UNICACH 6713, paratypes, 10 (4 c&s), 42.5–53.2 mm SL, Camino a Comitlan, Rio la Loma, Santa Maria Colotepec, Oaxaca, 16°01'08.1"N 96°50'41.3"W, 22 Apr 2015, W. Matamoros, M. J. Anzueto, J. A. Jamangape & I. Aguilar. MZ-UNICACH 6721, 2 c&s, 44.8–39.3 mm SL, Rio del Rancho Flor de Café, San Gabriel Mixtepec, Oaxaca, 30 Apr 2015, M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 7351, 6, 46.3–73.9 mm SL, Puente Mateo Piña, camino a Huatulco, San Mateo Piña, Oaxaca, 22 Sep 2018, E. Velazquez & M. J. Anzueto. *Profundulus punctatus*: **Guatemala**: MZ-UNICACH 7169, 32, 37.9–72.6 mm SL, Rio Batza, Colonia Campolla, puente Batza, Quetzaltenango, 9 Apr 2017, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 7182, 16, 36.3–75.0 mm SL, Rio Nil, puente Nil, El Acintal, Retalhuleo, 9 Apr 2017, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 7186, 14, 39.4–82.1 mm SL, Rio el Puentecito, Caserio, Retalhuleo, 9 Apr 2017, A. E. Gomez & E. Velazquez. **Mexico**: MZ-UNICACH 3100, 9, 36.8–57.0 mm SL, Cortina Copainala, Rio Grijalva, Chicoasen, Chiapas, 23 Apr 2009, E. Velazquez. MZ-UNICACH 4332, 6, 38.4–53.6 mm SL, El Chorreadero, Rio Grijalva, Chiapa de Corzo, Chiapas, 23 Oct 2010, E. Velazquez. MZ-UNICACH 4534, 14, 36.7–58.5 mm SL, El Chorreadero, Rio Grijalva, Chiapa de Corzo, Chiapas, 11 May 2011, M. J. Anzueto & E. Velazquez. UNICACH 5067, 3, 36.1–39.3 mm SL, Arroyo Rancho Mujular, Chiapa de Corzo, Chiapas, 12 Apr 2014, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 5074, 3, 37.1–46.7 mm SL, Rio Nandalumi, Chiapa de Corzo, Chiapas, 12 Apr 2014, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 5143, 4, 36.7–52.7 mm SL, Rio Nandalumi, Chiapa de Corzo, Chiapas, 28 May 2014, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 5085, 9, 36.7–52.7 mm SL, Arroyo Rancho Mujular, Chiapa de Corzo, Chiapas, 28 May 2014, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 5752, 4, 40.5–43.5 mm SL, Arroyo San Jose, Rio Grijalva, Villaflores, Chiapas, 26 Dec 2014, M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 6326, 25, 37.9–72.6 mm SL, Rio Lagartero, Arriaga, Chiapas, 7 Apr 2015, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 6355, 2 c&s, 67.3–62.7 mm SL, Rio Zapata, Cacahotan, Chiapas, 9 Apr 2015, A. E. Gomez. MZ-UNICACH 6578, 18 (2 c&s), 45.9–56.3 mm SL, Cascada Velo de Novia, Tonalá, Chiapas, 8 Apr 2015, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 6586, 17, 37.6–58.4 mm SL, Puente Rancho Bonito, Jiquipilas, Chiapas, 7 Apr 2015, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 6632, 21 (3 c&s), 43.3–72.0 mm SL, Rio Cintalapa, Escuintla, Chiapas, 9 Apr 2015, A. E. Gomez & E. Velazquez. *Tlaloc candalarius*: **Guatemala**: MZ-UNICACH 7566, topotypes, 18, 39.9–50.9 mm SL, Arroyo del Cenote, La Candelaria, Nentón, 15°56'59.9"N 91°46'53.6"W, 19 Dec 2019, E. Velazquez & M. J. Anzueto. **Mexico**: MZ-UNICACH 3898, 4, 39.5–40.8 mm SL, Arroyo Teopisca, Teopisca, Chiapas, 8 Aug 2008, E. Velazquez. MZ-UNICACH 3899, 8 (2 c&s), 39.5–99.2 mm SL, Arroyo Teopisca, Teopisca, Chiapas, 6 Oct 2008, E. Velazquez. MZ-UNICACH 5705, 7 (2 c&s), 41.3–45.6 mm SL, Arroyo Santa Barbara, Teopisca, Chiapas, 14 Dec 2014, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 5709, 1 c&s, 50.3 mm SL, Rio Grande, Comitán, Chiapas, 14 Dec 2014, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 6224, 1, 54.93 mm SL, Arroyo El Mangal, Socontenango, Chiapas, 25 Jan 2015, E. Velazquez. MZ-UNICACH 6813, 7 (4 c&s), 39.6–72.1 mm SL, Laguna Chukumaltik, Comitán, Chiapas, 22 Jul 2015, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 7245, 5, 26.5–65.4 mm SL, Lagos de Colon, La Trinitaria, Chiapas, 21 Oug 2015, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 7565, 52 (2 c&s), 38.8–86.4 mm SL, Arroyo Ojo de Agua, Tzimol, Chiapas, 15 Feb 2021, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 7567, 6, 53.1–79.3 mm SL, Arroyo Uninajab, Comitán, Chiapas, 6 Feb 2020, E. Velazquez & M. J. Anzueto. *Tlaloc hildebrandi*: **Mexico**: MZ-UNICACH 7567, 10 (2 c&s), 42.2–89.2 mm SL, Rio Amarillo, San Cristobal de las Casas, Chiapas, 6 Jul 2016, M. J. Anzueto & E. Velazquez. MZ-UNICACH 4330, 4 (3 c&s), 67.7–111.4 mm SL, Rio Fogotico, San Cristobal de las Casas, Chiapas, 4 May 2006, E. Velazquez. MZ-UNICACH 5694, 10, 47.9–63.1 mm SL, Puente Blanco, San Juan Chamula, Chiapas, 11 Dec 2014, A. E. Gomez & E. Velazquez. MZ-UNICACH 7562, 26, 37.9–63.1 mm SL, Rio San Pedro, Chenalho, Chiapas, 1 Sep 2016, M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 5711, 9 (2 c&s), 38.1–104.0 mm SL, Rio Osilhucum, Chenalho, Chiapas, 22 Sep 2007, E. Velazquez. MZ-UNICACH 6194, 9 (1 c&s), 49.5–79.7 mm SL, Arroyo las Limas, Chenalho, Chiapas, 7 Mar

2015, E. Velázquez. *Tlaloc labialis*: **Guatemala**: MZ-UNICACH 7233, 2 c&s, 35.5–65.6 mm SL, Rio Selegua, Huehuetan, 20 Apr 2017, W. Matamoros. **Mexico**: MZ-UNICACH 1402, 1, 64.1 mm SL, Rio Negro, Pueblo Viejo, Cintalapa, Chiapas, 11 Oct 2007, E. Velázquez & M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 1305, 16, 41.5–79.7 mm SL, Rio Negro Santa Maria, Cintalapa, Chiapas, 12 Jul 2007, M. J. Anzueto & A. E. Gomez. MZ-UNICACH 3467, 16 (2 c&s), 55.5–73.5 mm SL, Rio Zacalapa, Copainala, Chiapas, 6 Aug 2009, M. J. Anzueto & E. Velázquez. MZ-UNICACH 5274, 1, 67.0 mm SL, Rio Frio, Chiapilla, Chiapas, 1 Oct 2014, E. Velázquez. MZ-UNICACH 5353, 1 c&s, 89.4 mm SL, Rio Ojo de Agua, Emiliano Zapata, Chiapas, 2 Oct 2014, M. J. Anzueto. MZ-UNICACH 6607, 7, 38.9–101.9 mm SL, Rio Mazantic, El Bosque, Chiapas, 8, Mar 2015, A. E. Gomez. MZ-UNICACH 6740, 2 c&s, 64.5–75.7 mm SL, Rio La Venta, Ocozocoautla, Chiapas, 23 Apr 2015, M. J. Anzueto & E. Velázquez. MZ-UNICACH 7563, 26, 33.4–53.1 mm SL, Rio Hondo, Ixtapa, Chiapas, 20 Sep 2019, M. J. Anzueto & E. Velázquez. *Tlaloc portillorum*: **Honduras**: LSUMZ 31597, topotypes, 14 (3 c&s), 49.8–70.7 mm SL, Rio Calan, Quebrada Potrerillos, Comayagua, 14° 32'31"N 87° 52'55"W, 5 Dec 2007, W. Matamoros. MZ-UNICACH 7220, 21 (4 c&s), 40.8–62.9 mm SL, Puente de Piedra a Lepaterique, Francisco Morazan, 15 Apr 2017, W. Matamoros & A. E. Gomez. MZ-UNICACH 7222, 28 (2 c&s), 37.5–71.3 mm SL, Rio Nacaome, Las Tablas, Francisco Morazan, 15 Apr 2017, W. Matamoros & A. E. Gomez.

DISCUSSION

This study based on morphological characters supports relationships found between genera of Profundulidae as proposed in molecular analyses. Recently Morcillo *et al.* (2016) resurrected the genus *Tlaloc*, based on molecular evidence, recognizing the monophyly of the group. Monophyly of *Tlaloc* is supported in this study by five unique morphological characters: the mesethmoid is prominent and oval in shape, protruding from the posterior margins of the vomer, encompassing the posterior medial extension and making contact with the lateral ethmoids; the upper portion of the parasphenoid makes contact with the mesethmoid and does extend beyond the medial part of this last bone; the autopterotic fossa is reduced; the ventral margin of the lacrimal is straight; the dorsal margin of the interoperculum, with a long extension, exceeds the edge of the bone.

Profundulus was erected and diagnosed by Hubbs (1924), based on following diagnostic characters: The lateral rims of the genital aperture of the adult female are scarcely pronounced, surrounding not more than the first anal ray; the anal fin in the adult male is lower, instead of higher, than in either the young or the adult female. Miller (1955) in a review study of *Profundulus* (Cyprinodontidae) include these two traits and provided three new characters to characterize *Profundulus*: The shape of the premaxillary process, the nature of the hypural plate (divided into subequal parts by an open groove), and the number of gill rakers. Parenti (1981) distinguished *Profundulus* (representing the family Profundulidae) from all other cyprinodontoids by a large autopterotic fossa and a high number of gill rakers on the anterior arm of the first arch (14–23). With the reclassification of *Profundulus* in two genera, *Profundulus* and *Tlaloc* (Morcillo *et al.*, 2016), the diagnostic character of a large autopterotic fossa is now limited to *Profundulus*. We here add five characters to distinguish *Profundulus* from *Tlaloc*: The mesethmoid is small, crescent-shaped, and does not exceed the margins of the vomer; the vomer is greatly broadened anteriorly, lacks lateral processes and is in

contact with the lateral ethmoids; the upper portion of the parasphenoid, just in contact with the mesethmoid, does not extend beyond the medial part of this last bone; the dorsal margin of the interoperculum, with a short extension, does not exceed the edge of the bone; the ventral margin of the lacrimal is slightly concave.

Miller (1955) erected two subgenera based on the presence in *Profundulus* or absence in *Tlaloc* of conspicuously embedded scales in the preorbital region, the basal half or more of the caudal fin densely scaled, and the presence of a humeral spot in *Profundulus* or absence in *Tlaloc*. These characters were found in the analysis of only five described species. Although with most species these characters allow the separation of genera; in our review, including the 13 species currently described, none of these characters functioned as unique characters to diagnose genera.

González-Díaz *et al.* (2014) described eight osteological differences between the subgenera *Profundulus* and *Tlaloc* (seven of the skull and one of the axial skeleton), based on the analysis of only six species. Again, we observed only two characters to be considered of generic significance: the mesethmoid (small *vs.* large; our analyses corroborate the findings that were previously described by Uyeno, Miller, 1962), and the dorsal margin of the interoperculum (long *vs.* short extension). The form of the vomer (Y-shaped) was described by Costa (1989) as a character that defines the family Profundulidae; this character was described by González-Díaz *et al.* (2014) as a triangular-shaped character in *Profundulus* and Y-shaped in *Tlaloc*. We however observed Y-shaped vomers in both genera (not triangular) (Figs. 2B–C), so we agree with the description of Costa (1998).

The current study provides sufficient empirical evidence to confirm the separation and diagnosis of the genera *Tlaloc* and *Profundulus*. Analysis of morphological-osteological characters support the clades previously defined by molecular data. The comparative morphology has played an important role in the reconstruction of the evolutionary history and classification of cyprinodontiform fishes, often providing useful phylogenetic information at different taxonomic levels. For this reason, it would be important to incorporate this information to assess alternative hypotheses among members of the family Profundulidae and other groups within the Cyprinodontoides suborder.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Esteban Pineda for preparation of the map and to Manuel Anzueto and Fabiola Maza for their technical assistance in the field and laboratory. Comments on a manuscript from Michael Koeck helped to improve the final version substantially. This article is part of the doctoral thesis of the first author (SEDC), a PhD student in Biodiversity and Conservation of Tropical Ecosystems, from the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) Mexico. The Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) awarded a support scholarship for graduate studies to SEDC. The manuscript improved substantially thanks to the suggestions of two anonymous critics.

REFERENCES

- **Arratia G.** Actinopterygian postcranial skeleton with special reference to the diversity of fin ray elements, and the problem of identifying homologies. In: Arratia G, Schultze H-P, Wilson MVH, editors. *Mesozoic Fishes 4, Homology and Phylogeny*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany; 2008. p.49–101.
- **Álvarez J, Carranza J.** Descripción de un género y especie nuevos de peces Ciprinodontidos procedentes de Chiapas (México). *Ciencia*. 1951; 11(1–2):40–42.
- **Calixto-Rojas M, Lira-Noriega A, Rubio-Godoy M, Pérez-Ponce de León G, Pinacho-Pinacho CD.** Phylogenetic relationships and ecological niche conservatism in killifish (Profundulidae) in Mesoamerica. *J Fish Biol*. 2021; 99(2):396–410. <https://doi.org/10.1111/jfb.14727>
- **Costa WJEM.** Descriptive morphology and phylogenetic relationships among species of the Neotropical annual killifish genera *Nematolebias* and *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). *Neotrop Ichthyol*. 2006; 4(1):1–26. <https://doi.org/10.1590/S1679-6252006000100001>
- **Costa WJEM.** Phylogeny and classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha) a reappraisal. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS; 1998. p.537–60.
- **Del Moral-Flores LF, López-Segovia E, Hernández-Arellano T.** *Profundulus chimalapensis*, una nueva especie de pez ciprinodóntido (Cyprinodontiformes: Profundulidae) del Río Coatzacoalcos, México. *Rev Biol Trop*. 2020; 68(4):1185–97. <https://doi.org/10.15517/RBT.V68I4.40340>
- **Doadrio I, Carmona JA, Martínez E, De Sostoa A.** Genetic variation and taxonomic analysis of the subgenus *Profundulus*. *J Fish Biol*. 1999; 55(4):751–66. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00715.x>
- **Domínguez-Cisneros SE, Velázquez-Velázquez E, McMahan CD, Matamoros WA.** A new species of killifish of the genus *Profundulus* (Atherinomorpha: Profundulidae) from the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican State of Oaxaca. *Ichthyol Herpetol*. 2021; 109(4):949–57. <https://doi.org/10.1643/i2020156>
- **González-Díaz AA, Díaz-Pardo E, Soria-Barreto M, Martínez-Ramírez E.** Diferencias Osteológicas entre los Subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc* (Teleostei: Profundulidae). *Int J Morphol*. 2014; 32(3):1074–78. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300053>
- **Gosline WA.** The sensory canals of the head in some cyprinodont fishes, with particular reference to the genus *Fundulus*. *Occas Pap Mus Zool Univ Michigan*. 1949; 519:1–24. Available from: <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/56957>
- **Gosline WA.** Some osteological features of modern lower Teleostean Fishes. *Smithsonian Misc Collect*. 1961; 142(3):1–42. Available from: <https://repository.si.edu/handle/10088/22970>
- **Ghedotti MJ, Davis MP.** Phylogeny, classification, and evolution of salinity tolerance of the North American topminnows and killifishes, family Fundulidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Fieldiana, Life Earth Sci*. 2013; (7):1–65. <https://doi.org/10.3158/2158-5520-12.7.1>
- **Hoedeman JJ, Bronner FJ.** De Orde van de tandkarpertjes. VI. Cyprinodontiformes Berg, 1940. *Het Aquarium*; 1951; 22(1):6–10.
- **Hubbs CL.** Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. *Misc Pubs Univ Michigan Mus Zool*. 1924; 13:1–31. Available from: <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/56258>
- **Jamangapé JA, Velázquez-Velázquez E, Martínez-Ramírez E, Anzueto-Calvo MJ, Gomez EL, Domínguez-Cisneros SE, McMahan CD, Matamoros WA.** Validity and redescription of *Profundulus balsanus* Ahl, 1935 (Cyprinodontiformes: Profundulidae). *Zootaxa*. 2016; 4173(1):55–65. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4173.1.5>
- **Lozano-Vilano ML, De la Maza-Benignos M.** Diversity and status of Mexican killifishes. *J Fish Biol*. 2016; 90(1):3–38. <https://doi.org/10.1111/jfb.13186>
- **Matamoros WA, Schaefer JF, Hernández CL, Chakrabarty P.** *Profundulus kreiseri*, a new species of Profundulidae (Teleostei, Cyprinodontiformes) from northwestern Honduras. *ZooKeys*; 2012; 227:49–62. <http://doi:10.3897/zookeys.227.3151>

- **Miller RR.** A systematic review of the middle American fishes of the genus *Profundulus*. Misc Pubs Univ Michigan Mus Zool. 1955; 92:1–64. <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/57270>
- **Miller RR.** Peces dulceacuicolas de México. CONABIO, México D.F. 2009.
- **Morcillo F, Ornelas-García CP, Alcaraz L, Matamoros WA, Doadrio I.** Phylogenetic relationships and evolutionary history of the Mesoamerican endemic freshwater fish family Profundulidae (Cyprinodontiformes: Actinopterygii). Mol Phylogenet Evol. 2016; 94:242–51. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.002>
- **Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH.** Fishes of the world. John Wiley and Sons, Hoboken. 2016.
- **Parenti LR.** A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). Bull Am Mus Nat Hist. 1981; 168(4):335–557. <http://hdl.handle.net/2246/438>
- **Piller KR, Parker E, Lemmon AR, Lemmond EM.** Investigating the utility of Anchored Hybrid Enrichment data to investigate the relationships among the Killifishes (Actinopterygii: Cyprinodontiformes), a globally distributed group of fishes. Mol Phylogenet Evol. 2022; 173:107482. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107482>
- **Schultze H-P, Arratia G.** The caudal skeleton of basal teleosts, its conventions, and some of its major evolutionary novelties in a temporal dimension. In: Arratia G, Schultze P, Wilson MVH, editors. Mesozoic Fishes 5—Global Diversity and Evolution; 2013. p.187–246.
- **Taylor WR, Van Dyke GC.** Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. Cytium; 1985; 9(2):107–09.
- **Taylor WR.** An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. Proc U S Natl Mus. 1967; 122(3596):1–17. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.122-3596.1>
- **Uyeno T, Miller RR.** Relationships of *Empetrichthys erdisi*, a Pliocene Cyprinodontid fish from California, with remarks on the Fundulinae and Cyprinodontinae. Copeia; 1962; 1962(3):520–32. <https://doi.org/10.2307/1441173>

AUTHORS' CONTRIBUTION

Sara E. Domínguez-Cisneros: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing-original draft.

Omar Domínguez-Domínguez: Funding acquisition, Resources, Supervision.

Ernesto Velázquez-Velázquez: Conceptualization, Writing-review and editing.

Rodolfo Pérez-Rodríguez: Methodology, Resources, Supervision.

ETHICAL STATEMENT

Not applicable.

COMPETING INTERESTS

The author declares no competing interests.

HOW TO CITE THIS ARTICLE

- **Domínguez-Cisneros SE, Domínguez-Domínguez O, Velázquez-Velázquez E, Pérez-Rodríguez R.** Redescription and diagnoses of the genera *Profundulus* and *Tlaloc* (Cyprinodontiformes: Profundulidae), Mesoamerican endemic fishes. Neotrop Ichthyol. 2023; 21(1):e220089. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2022-0089>

Neotropical Ichthyology



This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

© 2023 The Authors. Diversity and Distributions Published by SBI



Official Journal of the Sociedade Brasileira de Ictiologia

VIII. CAPITULO II

DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE DE *PROFUNDULUS*.

A new species of killifish of the genus *Profundulus* from the upper reaches of the Papaloapan River from the Mexican state of Oaxaca.

Sara E. Dominguez-Cisneros, Ernesto Velázquez-Velázquez, Caleb D.
McMahan, and Wilfredo A. Matamoros.

Publicado en Revista **Ichthyology & Herpetology** (formerly *Copeia*), 22 de octubre de 2021

A New Species of Killifish of the Genus *Profundulus* (Atherinomorpha: Profundulidae) from the Upper Reaches of the Papaloapan River in the Mexican State of Oaxaca

Sara E. Dominguez-Cisneros^{1,2}, Ernesto Velázquez-Velázquez^{1,2}, Caleb D. McMahan³, and Wilfredo A. Matamoros^{1,2}

***Profundulus adani*, new species, is described from the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican state of Oaxaca. The uniqueness of this new species is supported by morphological and molecular evidence. A combination of color patterns and counts separate *P. adani*, new species, from its congeners. *Profundulus adani*, new species, is distinguished from all congeners by the absence of a humeral spot in individuals larger than 45 mm SL. It can further be distinguished from *P. balsanus*, *P. chimalapensis*, *P. kreiseri*, *P. oaxacae*, *P. parentiae*, and *P. punctatus* based on the absence of series of dark dots on the sides of the body. *Profundulus adani*, new species, shows a faded dark band that extends from the tip of the operculum to the end of the caudal peduncle; this band is absent in *P. balsanus* and *P. parentiae*. The new species is described using specimens collected in the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican state of Oaxaca; geographically this represents a significant range expansion and extends the Atlantic slope northernmost limit of the Profundulidae.**

***Profundulus adani* especie nueva se describe de la cuenca alta del río Papaloapan en el estado mexicano de Oaxaca. La distintividad de esta nueva especie está respaldada por evidencia morfológica y molecular. Una combinación de patrones de coloración y conteos separan a *P. adani* especie nueva de sus congéneres. *Profundulus adani* especie nueva se distingue de todos sus congéneres por la ausencia de una mancha humeral en individuos mayores de 45 mm SL. Además, se puede distinguir de *P. balsanus*, *P. chimalapensis*, *P. kreiseri*, *P. oaxacae*, *P. parentiae* y *P. punctatus* por la ausencia de líneas de puntos oscuros en los lados del cuerpo. *Profundulus adani* especie nueva muestra una banda oscura descolorida que se extiende desde la punta del opérculo hasta el final del pedúnculo caudal; esta franja está ausente en *P. balsanus* y *P. parentiae*. La nueva especie se describe con especímenes recolectados la cuenca alta del río Papaloapan en el estado mexicano de Oaxaca; geográficamente esto representa una expansión de rango significativa en la vertiente del Atlántico para *Profundulus*.**

PROFUNDULUS is a clade of freshwater killifishes native to northern and nuclear Middle America that belongs to the family Profundulidae (order Cyprinodontiformes). The genus is currently comprised of eight valid species (Del Moral-Flores et al., 2020), and most of the diversity is found in southern Mexico (six species) with only two species occurring exclusively in nuclear Middle America (*P. guatemalensis* and *P. kreiseri*). Profundulids are small fishes that can reach up to 120 mm standard length (SL) but are normally collected at sizes between 75–80 mm SL (Miller, 1955). Most of the distribution of *Profundulus* is in the Pacific slope (Fig. 1), in smaller rivers with steeper elevational gradients and lower species richness compared to Atlantic drainages (Smith et al., 2010). Faunal exchange between the two slopes, such as in the Papaloapan and Coatzacoalcos Rivers in Mexico and the Cahabon-Polochic, Motagua, Lempa, Ulúa, and Chamelecón Rivers in Central America, has been attributed to recent river capture events (Doadrio et al., 1999; Morcillo et al., 2016).

Across their range, species of *Profundulus* are common in smaller order streams and rarely found in higher order streams or main channels of rivers. Profundulids occur at altitudes ranging from ~260 masl along the Pacific slope of

Oaxaca (Matamoros et al., 2018) to above 1,700 masl in the highlands of Oaxaca (Ornelas-García et al., 2015). These killifishes occupy streams with abundant habitat structure and substrates dominated by boulders, rocks, and gravel (Cruz-Maza, 2018). They are frequently found in the undercuts of riverbanks where they seek refuge in submerged plants and tree roots (Matamoros, pers. obs.).

Miller (1955) conducted a taxonomic review of the Profundulidae based on morphometric and meristic characters for a substantial number of individuals (>9,000 specimens) across the entire distribution of *Profundulus* known at the time. Miller concluded that the family was comprised of a single genus (i.e., *Profundulus*) that could be divided into two species groups: the ‘*punctatus*’ group that included *P. punctatus* and *P. guatemalensis* and the ‘*labialis*’ group that included *P. labialis*, *P. candalarius*, and *P. hildebrandi*.

Although Miller’s study was thorough, there was always the potential existence of hidden diversity (i.e., cryptic species) within *Profundulus* that traditional morphological data were unable to detect. Over the last decade, ichthyological explorations in southern Mexico and Central America combined with the integration of molecular approaches in

¹ Colección de Ictiología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México, CP, 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; Email: (SED-C) sara.dominguez@unicach.mx; (EV-V) er_velazquez@yahoo.com; and (WAM) wilmamatamoros@yahoo.com. Send reprint requests to WAM.

² Posgrado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH, Libramiento Norte #1150, Col. Lajas Maciel, C.P. 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

³ Field Museum of Natural History, 1400 S. Lake Shore Drive, Chicago, Illinois 60605; Email: cmcmahan@fieldmuseum.org. Submitted: 3 December 2020. Accepted: 17 May 2021. Associate Editor: W. L. Smith.

© 2021 by the American Society of Ichthyologists and Herpetologists DOI: 10.1643/i2020156 Published online: 22 October 2021

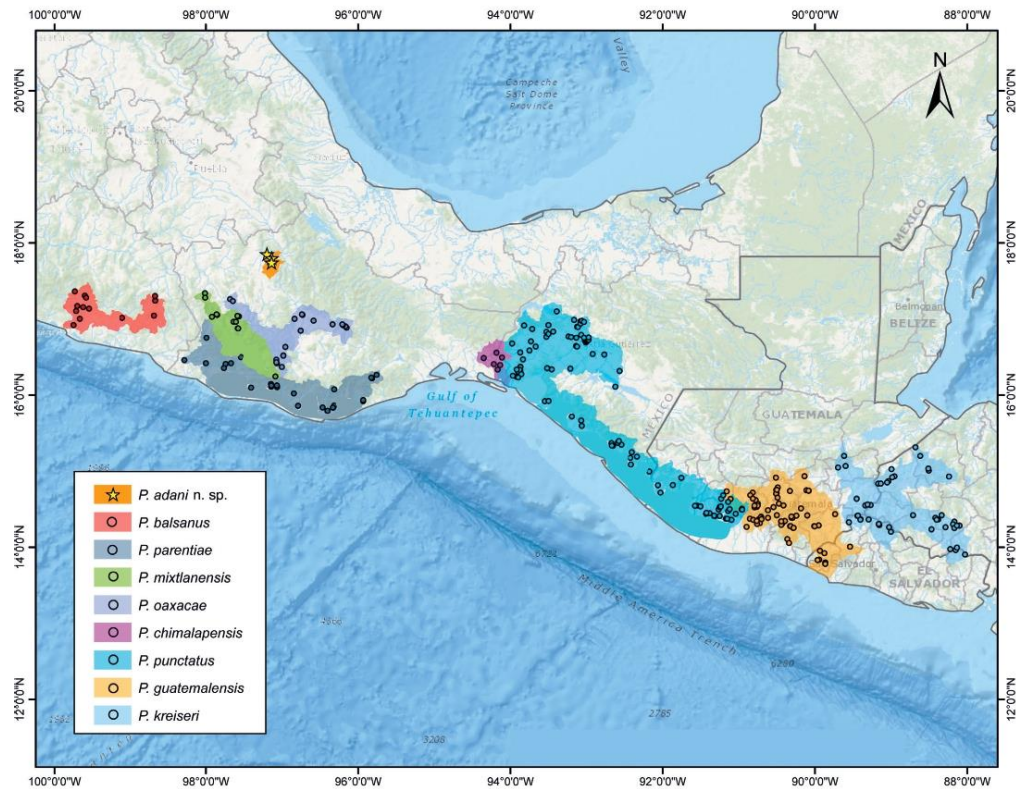


Fig. 1. Known geographic distributions of species in the genus *Profundulus*. Localities of *Profundulus adani* depicted by yellow stars. Distributional data from UNICACH-MZ-P and complemented with data from global aggregators such as FishNet2 (accessed through the Fishnet2 Portal, www.fishnet2.net, 2020-12-10) and the Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2020).

taxonomy has led to the description of four new species of *Profundulus* and the resurrection of one species from synonymy. *Profundulus kreiseri* was described based on material from the Atlantic slope of Honduras in the Ulúa and Chamelecón Rivers (Matamoros et al., 2012) and later also recorded from El Salvador (McMahan et al., 2013) and Guatemala (Morcillo et al., 2016). *Profundulus mixtlanensis* was later described from the highlands of the Mixteco region of Oaxaca (Ornelas-García et al., 2015) after molecular data demonstrated that *P. oaxacae* was a congener that inhabits the same region but is distinctive from *P. mixtlanensis*. *Profundulus balsanus*, placed in the synonymy of *P. punctatus* by Miller (1955), was resurrected on the basis of morphological and molecular data (Jamangapé et al., 2016), and *P. parentiae* was described using an integrative taxonomic approach by Matamoros et al. (2018). Most recently, Del Moral-Flores et al. (2020) described *P. chimalapensis* from the Coatzacoalcos River in Mexico. In this study, we describe a new species of *Profundulus* from the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican state of Oaxaca.

MATERIALS AND METHODS

Fish collection.—Sampling was performed from 19 to 21 July 2018 at three localities in the Papaloapan River (Fig. 1). Fishes were captured using a combination of collection gear that included seines, cast-nets, and electrofishing. After capture, fishes were euthanized with an overdose of MS222 following the ASIH Guidelines for the Use of Fishes in Research. In the field, a fin clip was removed from specimens and preserved in 95% ethanol. Fishes were then fixed in a solution of 10% formalin for at least 72 hours, then rinsed for 24 hours in tap water, and transferred to a solution of 70% ethanol for final preservation. Samples were deposited at the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas Museo de Zoología (UNICACH-MZ-P), Universidad Nacional Autónoma de México Colección Nacional de Peces (CNPE-IBUNAM), and the Field Museum of Natural History (FMNH). Institutional abbreviations follow Sabaj (2020).

Morphological data.—A set of 17 standardized morphometric measurements (Table 1) and nine counts (Table 2) were taken from all specimens. All measurements and counts followed

Table 1. Morphometric data of holotype and paratypes ($n = 74$) of *Profundulus adani*. Standard length expressed in millimeters; other measurements expressed as either percent of standard length or percent of head length. In the paratype columns, the first two numbers represent the measurement range, followed by the mean in parentheses.

| Character | Holotype | Paratypes | |
|-----------------------------------|----------|------------------|------------------|
| | Male | Males (39) | Females (35) |
| Standard length (mm) | 64.7 | 38.7–83.7 (54.5) | 36.7–77.9 (53.5) |
| Percent of standard length | | | |
| Head length | 29.0 | 26.1–33.9 (28.9) | 26.1–30.6 (28.2) |
| Predorsal length | 66.8 | 64.7–71.0 (67.3) | 65.1–73.5 (69.1) |
| Prepelvic length | 52.5 | 50.1–54.8 (52.5) | 49.0–57.6 (54.2) |
| Anal origin to caudal base | 33.9 | 16.0–37.9 (34.2) | 29.4–36.6 (31.9) |
| Body greatest depth | 26.6 | 17.4–31.0 (26.6) | 20.4–29.4 (25.5) |
| Body greatest width | 12.7 | 11.3–25.6 (14.7) | 13.5–20.8 (15.9) |
| Caudal-peduncle length | 17.5 | 14.9–20.0 (17.7) | 16.0–21.9 (18.2) |
| Caudal-peduncle depth | 13.8 | 12.9–19.8 (14.3) | 11.7–14.0 (13.0) |
| Dorsal-fin base length | 15.8 | 13.0–18.3 (15.8) | 11.7–16.4 (13.6) |
| Anal-fin base length | 17.4 | 15.8–19.4 (17.6) | 13.5–15.9 (14.7) |
| Percent of head length | | | |
| Head depth | 73.8 | 61.0–80.2 (72.2) | 59.0–77.0 (71.8) |
| Head width | 66.2 | 55.6–75.3 (65.5) | 54.8–97.5 (70.0) |
| Interorbital least-bony width | 47.3 | 38.9–50.2 (45.9) | 41.8–49.0 (46.2) |
| Orbit length | 22.2 | 19.5–28.5 (23.5) | 20.5–49.0 (24.3) |
| Snout length | 34.8 | 28.1–38.2 (33.8) | 26.6–37.5 (33.3) |
| Upper-jaw length | 34.2 | 21.1–36.6 (30.1) | 25.3–35.8 (30.6) |

Miller (1948, 1955) and included: standard length, head length, predorsal length, prepelvic length, anal-fin origin to caudal base, body greatest depth, body greatest width, caudal-peduncle length, caudal-peduncle depth, dorsal-fin basal length, anal-fin basal length, head depth, head width, interorbital least bony width, orbit length, snout length, upper jaw length, dorsal-fin rays, anal-fin rays, principal caudal-fin rays, principal pectoral-fin rays, pelvic-fin rays, lateral-line scales, predorsal scales, scales around the body, and scales around caudal peduncle. Measurements were taken with digital calipers to the nearest 0.1 mm and are presented as percents of standard length (SL) with exception of those related to head morphology, which are expressed as percents of head length (HL). In cyprinodontiforms, the last two fin rays of the anal and dorsal fins bifurcate internally; thus, the counts of elements in these fins were performed by counting all rays in the fin and subtracting one as suggested

Table 2. Meristic data of holotype and paratypes ($n = 68$) of *Profundulus adani*. In the paratype columns, the first two numbers represent the measurement range, followed by the mode in parentheses.

| Meristic | Holotype | Paratypes | |
|-------------------------------|----------|------------|--------------|
| | Male | Males (36) | Females (32) |
| Dorsal-fin rays | 12 | 11–12 (11) | 10–12 (11) |
| Anal-fin rays | 14 | 13–15 (14) | 13–16 (14) |
| Principal caudal-fin rays | 20 | 18–23 (20) | 19–22 (20) |
| Principal pectoral-fin rays | 16 | 15–18 (16) | 15–18 (20) |
| Pelvic-fin rays | 6 | 6–7 (6) | 6–6 (6) |
| Lateral-line scales | 33 | 32–35 (33) | 32–35 (33) |
| Pre-dorsal scales | 25 | 23–27 (25) | 23–28 (26) |
| Scales around the body | 30 | 26–39 (28) | 21–34 (32) |
| Scales around caudal peduncle | 17 | 15–18 (17) | 16–18 (17) |

by Miller (1948). A summary of morphometric measurements and counts is provided in Tables 1–2. A list of comparative material is presented in the Material Examined section. Comparisons with the recently described *P. chimalapensis* was based on the published description in Del Moral-Flores et al. (2020).

DNA sequencing and phylogenetic analyses.—Total genomic DNA was extracted from ethanol-preserved tissues using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc.). The cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene was amplified using polymerase chain reaction. Amplification conditions, primers, and sequencing protocols are described by Jamangapé et al. (2016). Our molecular analysis included 27 specimens representing 12 species (Table 3), including all species of the genus *Profundulus*. We also included four species of the genus *Tlaloc* (*T. candaliarius*, *T. hildebrandi*, *T. labialis*, and *T. portillorum*) as outgroups. Choice of outgroup taxa was based on previous molecular analyses of Profundulidae (e.g., Matamoros et al., 2012, 2018; Jamangapé et al., 2016; Morcillo et al., 2016). Newly generated sequences were deposited in GenBank (Table 3).

We used MUSCLE (Edgar, 2004) embedded in MEGA X (Kumar et al., 2018) to align sequences. Alignments were inspected by eye for accuracy, and sequences were trimmed at the 5' and 3' ends to minimize missing data. We calculated genetic distances (p -distances) between species and clades in MEGA X. A molecular phylogeny was built using Bayesian analyses in MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012). The analyses were performed under default conditions, with one million generations. We used Tracer 1.7 (Rambaut et al., 2018) to check the trace files and ensure the chains had reached convergence and discarded the first 25% of trees as burn-in. A 50% majority-rule consensus tree was obtained from post-burn-in trees.

Table 3. List of specimens used for molecular phylogeny with their GenBank accession numbers and geographic information. Species names coded as in Figure 2. Bold accession numbers are sequences that were newly deposited in GenBank. N/A = data not available, Dep = Department, Mex = Mexico, GUA = Guatemala, ESV = El Salvador, HON = Honduras.

| Species | GenBank | Country | State/Dep. | Locality | Latitude | Longitude | Tissue catalog no. |
|-----------------------------------|-----------------|---------|---------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| <i>P. adani</i> , new species [1] | MW522557 | MEX | Oaxaca | S. Miguel Huautla | 17°44'28"N | 97°8'18"W | UNICACH-MZ-P 2845 |
| <i>P. adani</i> , new species [2] | MW522558 | MEX | Oaxaca | S. Miguel Huautla | 17°44'28"N | 97°8'18"W | UNICACH-MZ-P 2846 |
| <i>P. adani</i> , new species [3] | MW522559 | MEX | Oaxaca | S. Pedro Nodon | 17°47'59"N | 97°5'18"W | UNICACH-MZ-P 2856 |
| <i>P. adani</i> , new species [4] | MW522560 | MEX | Oaxaca | S. Pedro Nodon | 17°47'59"N | 97°5'18"W | UNICACH-MZ-P 2857 |
| <i>P. adani</i> , new species [5] | MW522561 | MEX | Oaxaca | Sta. María Ixcatlán | 17°51'3"N | 97°11'57.4"W | UNICACH-MZ-P 2867 |
| <i>P. adani</i> , new species [6] | MW522562 | MEX | Oaxaca | Sta. María Ixcatlán | 17°51'3"N | 97°11'57.4"W | UNICACH-MZ-P 2868 |
| <i>P. balsanus</i> [1] | KX611579 | MEX | Guerrero | Malinaltepec | 17°14'9.7"N | 98°39'55.9"W | UNICACH-MZ-P 366 |
| <i>P. balsanus</i> [2] | KX611580 | MEX | Guerrero | Malinaltepec | 17°14'9.7"N | 98°39'55.9"W | UNICACH-MZ-P 367 |
| <i>P. balsanus</i> [3] | KX611581 | MEX | Guerrero | Malinaltepec | 17°14'9.7"N | 98°39'55.9"W | UNICACH-MZ-P 368 |
| <i>P. balsanus</i> [4] | KX611582 | MEX | Guerrero | Malinaltepec | 17°14'9.7"N | 98°39'55.9"W | UNICACH-MZ-P 369 |
| <i>P. balsanus</i> [5] | KX611583 | MEX | Guerrero | Malinaltepec | 17°14'9.7"N | 98°39'55.9"W | UNICACH-MZ-P 370 |
| <i>P. guatemalensis</i> | MW522563 | GUA | Escuintla | Río Cantil | 14°21'23.1"N | 90°48'31.9"W | UNICACH-MZ-P 2703 |
| <i>P. kreiseri</i> [1] | MW522564 | ESV | Chalatenango | S. José El Carao | 14°7'58.9"N | 89°9'40.8"W | UNICACH-MZ-P 168 |
| <i>P. kreiseri</i> [2] | MW522565 | ESV | Chalatenango | S. José El Carao | 14°7'58.9"N | 89°9'40.8"W | UNICACH-MZ-P 173 |
| <i>P. kreiseri</i> [3] | MH114097 | ESV | Chalatenango | S. José El Carao | 14°7'58.9"N | 89°9'40.8"W | UNICACH-MZ-P 166 |
| <i>P. mixtlanensis</i> | MH114096 | MEX | Oaxaca | Sta. María Zacatepec | 16°44'56.8"N | 97°59'32.6"W | UNICACH-MZ-P 470 |
| <i>P. oaxacae</i> | KX611584 | MEX | Oaxaca | Mitla | 16°55'35.8"N | 96°20'3.8"W | UNICACH-MZ-P 395 |
| <i>P. parentiae</i> [1] | MH114091 | MEX | Oaxaca | in road to Comitlán | 16°1'4.5"N | 96°50'39.4"W | UNICACH-MZ-P 251 |
| <i>P. parentiae</i> [2] | MH114092 | MEX | Oaxaca | Sta. María Huatulco | 15°50'4.5"N | 96°19'47.8"W | UNICACH-MZ-P 210 |
| <i>P. parentiae</i> [3] | MH114093 | MEX | Oaxaca | Sta. Pedro Pochutla | 15°47'24"N | 96°24'4.7"W | UNICACH-MZ-P 229 |
| <i>P. parentiae</i> [4] | MH114094 | MEX | Oaxaca | Sta. María Huatulco | 15°51'43.8"N | 96°18'46.8"W | UNICACH-MZ-P 196 |
| <i>P. parentiae</i> [5] | MH114095 | MEX | Oaxaca | S. Gabriel Mixtepec | 16°7'18.2"N | 97°4'2.8"W | UNICACH-MZ-P 497 |
| <i>P. punctatus</i> | KX611585 | MEX | Chiapas | Cacahoatan | 14°59'31.2"N | 92°10'32.9"W | N/A |
| <i>Tlaloc candalarius</i> | KX632152 | MEX | Chiapas | Comitan | 16°16'50.6"N | 92°7'21.9"W | N/A |
| <i>Tlaloc hildebrandi</i> | KX632151 | MEX | Chiapas | S. Cristóbal de las Casas | 16°44'37.2"N | 92°36'7.3"W | N/A |
| <i>Tlaloc labialis</i> | AY356596 | MEX | Chiapas | Teopisca | N/A | N/A | N/A |
| <i>Tlaloc portillorum</i> | MW522566 | HON | Fran. Morazán | Lepaterique | 14°5'2.7"N | 87°25'56.9"W | UNICACH-MZ-P 2750 |

RESULTS

Molecular analysis.—Results of the Bayesian analysis suggested that *P. adani*, new species (Fig. 2), formed a lineage sister to a clade that included *P. balsanus*, *P. guatemalensis*, *P. kreiseri*, *P. oaxacae*, *P. parentiae*, and *P. punctatus*. This clade was sister to *P. mixtlanensis*. Divergence between *P. adani*, new species, and congeners ranged from 7.4% (with *P. mixtlanensis*) to 10.1% (*P. balsanus*) based on COI sequences (Table 4).

Profundulus adani, new species

urn:lsid:zoobank.org:act:D5F4A140-E101-48E8-913A-9D365B2DCA44

Papaloapan Killifish

Figures 3–4, Tables 1–2

Holotype.—CNPE-IBUNAM 23796 (ex UNICACH-MZ-P 07382), male, 64.7 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Arroyo de la Entrada in Santa María Ixcatlán in the municipality of Santa María Ixcatlán, 17°51'3"N, 97°11'57.4"W, E. Velázquez-Velázquez and M. Anzueto-Calvo, 19 June 2018.

Paratypes.—CNPE-IBUNAM 23797, 3, 39.0–59.1 mm SL, FMNH 145002, 3, 43.1–58.9 mm SL, UNICACH-MZ-P

07382, 32, 36.7–68.2 mm SL, same locality and collecting event as holotype; CNPE-IBUNAM 23798, 3, 42.7–48.5 mm SL, UNICACH-MZ-P 07342, 18, 38.3–60.8 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Arroyo Nodón, under bridge by dirt road close to the town of San Pedro Nodón in the municipality of San Miguel Huatla near the town San Pedro Nodón, 17°47'59"N, 97°8'11.9"W, E. Velázquez-Velázquez and M. Anzueto-Calvo, 20 June 2018; FMNH 145003, 3, 67.8–75.0 mm SL, UNICACH-MZ-P 07343, 12, 52.4–83.7 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Río Huatla, Departure to San Miguel Huatla close to the town of San Miguel Huatla, in the municipality of San Miguel Huatla, 17°44'28"N, 97°20'15.4"W, E. Velázquez-Velázquez and M. Anzueto-Calvo, 20 June 2018.

Diagnosis.—*Profundulus adani* is diagnosed from all congeners by the absence of a humeral spot in individuals larger than 45 mm SL (Figs. 3–4). It can further be distinguished from *P. balsanus*, *P. chimalapensis*, *P. kreiseri*, *P. oaxacae*, *P. parentiae*, and *P. punctatus* by the absence of series of dark dots on sides of the body. *Profundulus adani* shows a faded dark band that extends from the opercle to the base of the caudal fin; this band is absent in *P. balsanus* and *P. parentiae*. *Profundulus*

Table 4. Genetic (p -distances) distances between all species of *Profundulus* based on the mitochondrial COI gene.

| Species | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1. <i>P. adani</i> , new species | 0 | | | | | | | |
| 2. <i>P. mixtlanensis</i> | 0.074 | 0 | | | | | | |
| 3. <i>P. kreiseri</i> | 0.081 | 0.070 | 0 | | | | | |
| 4. <i>P. guatemalensis</i> | 0.085 | 0.070 | 0.015 | 0 | | | | |
| 5. <i>P. parentiae</i> | 0.091 | 0.069 | 0.025 | 0.023 | 0 | | | |
| 6. <i>P. punctatus</i> | 0.091 | 0.078 | 0.028 | 0.031 | 0.038 | 0 | | |
| 7. <i>P. oaxacae</i> | 0.098 | 0.075 | 0.035 | 0.028 | 0.038 | 0.031 | 0 | |
| 8. <i>P. balsanus</i> | 0.101 | 0.083 | 0.038 | 0.033 | 0.030 | 0.043 | 0.045 | 0 |

adani can be further differentiated from *P. oaxacae* by possessing a greater number of lateral-line scales; mode 30 with a range of 29–31 in *P. oaxacae*, versus mode 33 and a range of 32–35 in *P. adani*. *Profundulus adani* can be separated from *P. guatemalensis* by the absence of pearly-milky

coloration on the belly that is present in *P. guatemalensis*. *Profundulus adani* can be separated from *P. parentiae* based on pre-dorsal scale counts; mode 25 with a range of 23–27 in males and mode 26 with a range of 23–28 in females, versus mode 22 and range 18–22 in *P. parentiae*.

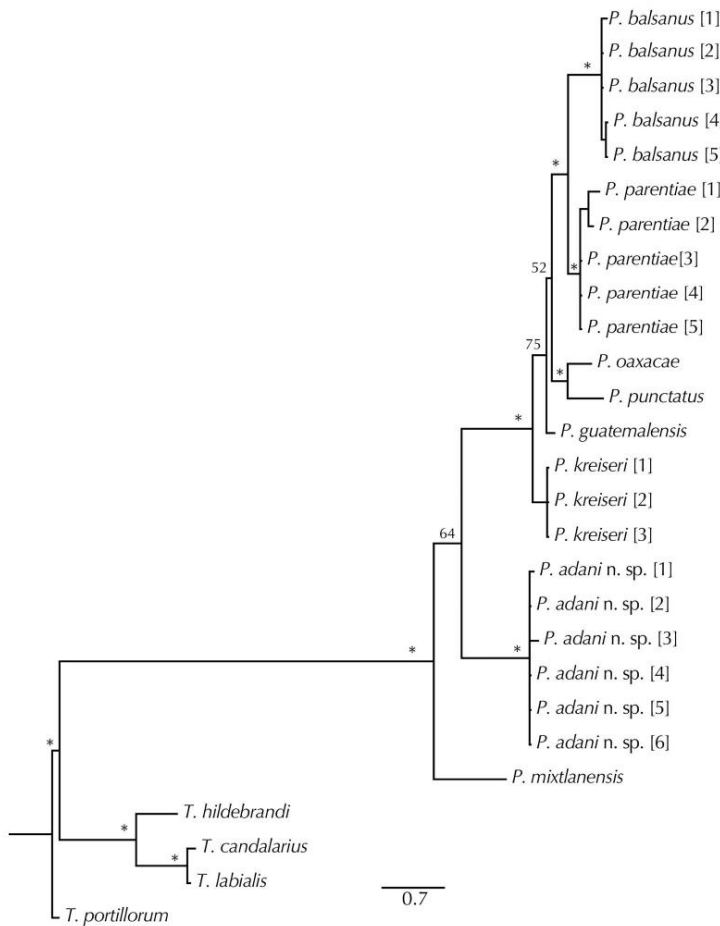


Fig. 2. Bayesian phylogeny showing relationships of *Profundulus adani* with respect to other species of *Profundulus*. Numbers above nodes represent Bayesian posterior probabilities; * indicates posterior probability ≥ 95 . See Data Accessibility for tree file.



Fig. 3. *Profundulus adani*, holotype, CNPE-IBUNAM 23796, 64.7 mm SL. Mexico, State of Oaxaca, Arroyo de la Entrada in Santa María Ixcatlán in the municipality of Santa María Ixcatlán, 17°51'3"N, 97°11'57.4"W.

Description.—Morphometric and meristic data in Tables 1–2. Largest examined male 83.7 mm SL, largest female 77.9 mm SL. Dorsal profile in lateral view nearly straight from snout to posterior margin of head, from this point to posterior end of dorsal fin slightly concave, approximately straight on caudal peduncle. Ventral profile in lateral view convex from lower jaw to end of anal-fin base, nearly straight on caudal peduncle. Body greatest depth at vertical line above insertion of pelvic fin. Body moderately deep and laterally compressed. Snout projected with terminal mouth, with lower jaw extending past upper. Dorsal fin rounded in both males and females. Anal fins of males rounded, enlarged in females. Tip of pelvic fin not reaching to urogenital papillae. Dorsal-fin rays modally 11 (range 11–12) in males, modally 11 (range 10–12) in females; anal-fin rays modally 14 (range 13–15) in males, modally 14 (range 13–16) in females; principal caudal-fin rays modally 20 (range 18–23) in males; modally 20 (range 19–22) in females; pectoral-fin rays modally 16 (range 15–18) in males and females; pelvic-fin rays modally 6 in males and females, rarely 7. Scales small and cycloid. Trunk and head fully scaled except ventral surface of head. Scales absent on dorsal- and anal-fin bases; caudal fin covered by scales above and below midline.

Preserved coloration.—Dorsum and flanks brownish, with head showing light brown coloration and slightly darker from end of head to end of dorsal fin; ventral side even

lighter. Preopercle light yellow. Dark stripe present on sides of body, running from opercle to base of caudal fin, more intense and thicker in middle part of body between dorsal and anal fins; stripe possesses light speckles distributed throughout it.

Live coloration.—Light yellow on almost entire body with silver colors on scales on midline of body (Fig. 4). Golden yellow blotch covering operculum and reaching to base of pectoral fin. Dark stripe present on side of body, running from opercle to base of caudal fin. Base of dorsal and anal fins light yellow followed by hyaline section, distal edges of dorsal fin orange. Anterior half of caudal fin darkened, posterior half hyaline and slightly orange at edge. Pectoral and pelvic fins hyaline. Base of dorsal and anal fins light brown with opaque-white edges. Posterior edge of caudal fin hyaline and rest of fin darkened.

Distribution and habitat.—The known distribution of *P. adani* is limited to the three localities reported here in the upper reaches of the Papaloapan River in the Mexican state of Oaxaca (Fig. 1). These three localities are small creeks of high order at altitudes above 1500 masl, characterized by shallow streams with boulders, rocks, and gravel dominating the substrate (Fig. 5).

Etymology.—In recognition of his contributions to the study and conservation of freshwater fishes in southern Mexico,



Fig. 4. Live specimen of *Profundulus adani*, UNICACH-MZ-P 07382. Mexico, State of Oaxaca, Arroyo Nodón, municipality of San Miguel Huatla near the town San Pedro Nodón, 17°47'59"N, 97°8'11.9"W.

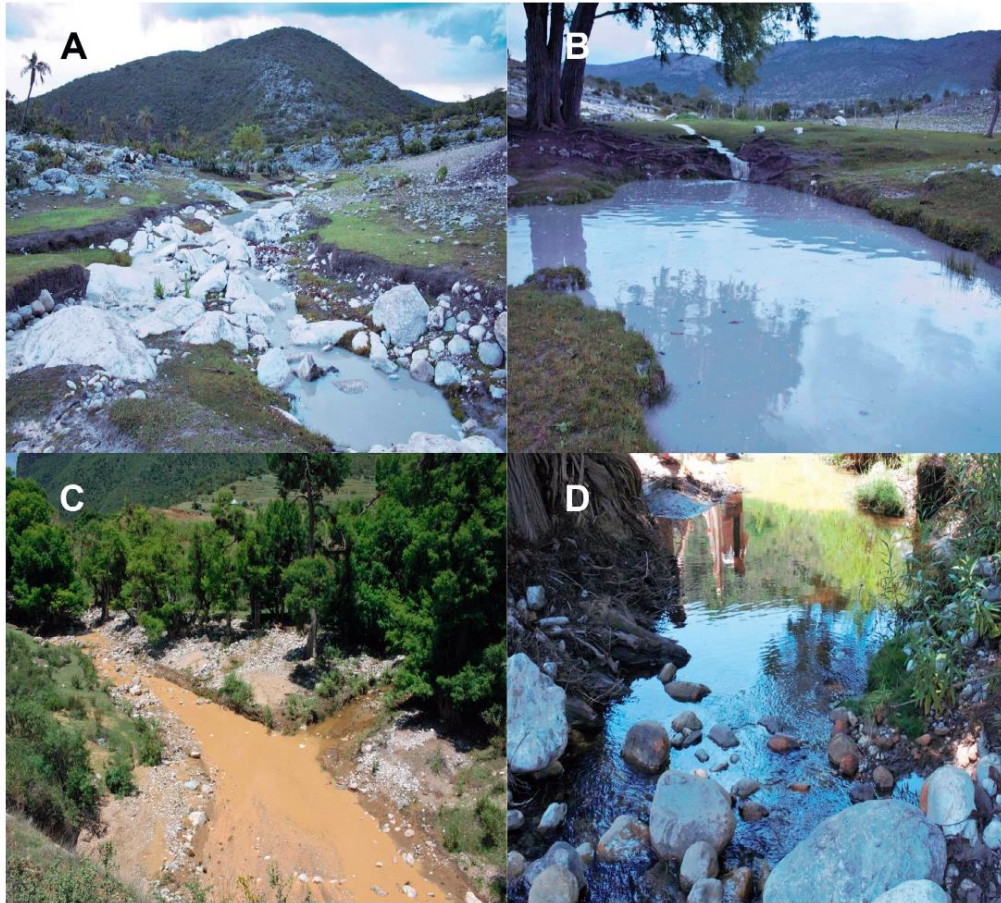


Fig. 5. Habitats of *Profundulus adani* in the Papaloapan River drainage. (A–B) Type locality, Santa María Ixcatlan. (C) Arroyo Nodón, close to San Pedro Nodón. (D) Río Huatla.

this species is named after our friend, colleague, and Mexican ichthyologist Adán E. Gómez González who tragically passed away in January 2018.

DISCUSSION

The taxonomy of *Profundulus* has a long and complex history. Until 1924, described species of profundulids (e.g., *P. guatemalensis*, *P. oaxacae*, *P. punctatus*, and *T. labialialis*) were placed in the genus *Fundulus* (Garman, 1895) because of morphological resemblance. The genus *Profundulus* was described by Hubbs (1924) based on morphological and distributional differences with *Fundulus*. At the familial level, Myers (1938) placed *Profundulus* in the family Cyprinodontidae, and Hoedeman and Bronner (1951) proposed the tribe Profundulidi for old and new world cyprinodontid genera

including *Adinia*, *Kosswigichthys*, *Profundulus*, and *Valencia*. Parenti (1981) later recognized Profundulidae as a distinct family comprised of only the genus *Profundulus*.

In his comprehensive revision of *Profundulus*, Miller (1955) studied patterns of external morphological and meristic characters and concluded that the genus was comprised of five species grouped into two distinctive species groups. Later studies examined molecular data and concluded that Profundulidae was more species-rich than previously suggested (e.g., Doadrio et al., 1999; Jamangapé et al., 2016; Morcillo et al., 2016; Matamoros et al., 2018). Furthermore, it was also concluded that the two species groups suggested by Miller (1955) should be recognized as valid genera. As a result, the genus *Tlaloc* [ex *P. labialis* species group], which was proposed by Álvarez and Carranza (1951) and used as a

subgenus by Miller (1955), was re-elevated (Morcillo et al., 2016).

Our molecular data support the distinctiveness of *P. adani* and suggest that the species is sister to all other members of the genus less *P. mixtlanensis*. This new species has never been included in a phylogenetic study as unrecognized or cryptic diversity, and future work incorporating additional data could shed light on alternative hypotheses of phylogenetic relationships. In addition to recovering *P. adani* within the genus *Profundulus* based on our molecular phylogenetic results, *P. adani* possesses morphological characters diagnosing the genus *Profundulus*: presence of a dark humeral spot (in small individuals of *P. adani*), anterior half or more of the caudal fin covered by scales, and a scaled lacrimal bone (Miller, 1955; Morcillo et al., 2016).

Morcillo et al. (2016) suggested that the genus *Profundulus* diverged in the early Miocene (~20.2 Mya). This coincides with orogeny in southern Mexico and northern Central America that divided Atlantic and Pacific slopes in the region (Doadrio et al., 1999), likely promoting the origin and diversification of *Profundulus* (primarily distributed in the Pacific slope) and *Tlaloac* (almost exclusively found in the Atlantic slope). The occurrence of species of *Profundulus* in Atlantic-slope drainages (e.g., Papaloapan, Coatzacoalcos, Grijalva, Cahabon, Motagua, Uluá, and Chamelecon Rivers) has been hypothesized to be the result of river capture events (Doadrio et al., 1999; Ornelas-García et al., 2008; Morcillo et al., 2016). The population of *Profundulus* in the Coatzacoalcos River (now *P. himalapensis*) was previously considered the northern- and westernmost limit of the genus in the Atlantic slope (Miller, 1955); thus, the description of *P. adani* from the upper reaches of the Papaloapan River, approaching but not reaching the Trans-Mexican Volcanic Belt, is an important and substantial range extension for Middle American killifishes.

Over the last decade our knowledge of diversity, delimitation, and geographic ranges for species of *Profundulus* has substantially increased. These data and studies are important for understanding the individual clades within this lineage of fishes, which will allow for robust research and exploration necessary to more fully understand the evolutionary and biogeographic history of Middle American killifishes.

MATERIAL EXAMINED

Profundulus balsanus: UNICACH-MZ-P 6712, 22, 34.21–64.68 mm SL, Mexico, State of Guerrero, Malinaltepec, Río Malinaltepec, 17°13'50.5"N, 98°40'1.1"W.

Profundulus guatemalensis: UNICACH-MZ-P 7195, 9, 38.7–50.4 mm SL, Guatemala, Escuintla, Arroyo tributario del Río Achiguate, Caserío las Cañas, 14°23'3.03"N, 90°51'8.61"W; UNICACH-MZ-P 7198, 3, 39.4–57.4 mm SL, Guatemala, Santa Rosa Oratorio, Río las Marías, Las Cabezas, puente Las Marías, 14°11'11.98"N, 90°61'17.67"W.

Profundulus kreiseri: UNICACH-MZ-P 7205, 26, 37.1–72.7 mm SL, El Salvador, Chalatenango, tributario del Río Lempa, Quebrada, Los Tecomates, 14°18'12.11"N, 89°9'40.45"W; UNICACH-MZ-P 7214, 22, 38.6–63.3 mm SL, El Salvador, Chalatenango, Río Nonuapa, tributario Río Lempa, 14°18'21.85"N, 89°9'10.32"W.

Profundulus mixtlanensis: UNICACH-MZ-P 6715, 22, 39.3–70.6 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Mitla, Arroyo Grande, Tributario del Río la Hormiga, 16°53'0.5"N, 96°23'19.9"W; UNICACH-MZ-P 6716, 27, 41.6–60.8 mm SL, Oaxaca, Putla, 2 km de la Ranchería La Soledad, Río San Isidro, 17°2'25.8"N, 97°54'41.8"W.

Profundulus oaxacae: UNICACH-MZ-P 6714, 34, 28.9–63.2 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Mitla, Río Salado-Subcuenca del Atoyac, 16°55'35.8"N, 96°20'3.7"W.

Profundulus parentiae: UNICACH-MZ-P 6574, 6, 27.5–50.2 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Santa María Huatulco, Municipality of Santa María Huatulco, Honduras de toro at 100 m from bridge, Huatulco, 15°50'4.5"N, 96°19'47.8"W; UNICACH-MZ-P 6575, 10, 50.4–68.3 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Santa María Huatulco, Toma de Agua-Río Huatulco, 15°51'43.8"N, 96°18'46.8"W; UNICACH-MZ-P 6576, 10, 40.3–67.8 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Pochutla, arroyo de la calle central, colonia San Miguel Figueroa, Pochutla, 15°47'24"N, 96°24'4.7"W; UNICACH-MZ-P 6713, 10, 42.5–53.2 mm SL, Mexico, State of Oaxaca, Santa María Colotepec, Camino a Comitlán, Río la Loma, close to Santa María Colotepec, 16°1'4.5"N, 96°50'39.4"W.

Profundulus punctatus: UNICACH-MZ-P 4334, 8, 36.7–58.5 mm SL, Mexico, State of Chiapas, Chiapa de Corzo, Col. El Recuerdo, 16°42'55.9"N, 92°3'8.1"W; UNICACH-MZ-P 5074, 3, 37.16–46.8 mm SL, UNICACH-MZ-P 5085, 8, 34.6–45.1 mm SL, UNICACH-MZ-P 5143, 4, 36.8–52.7 mm SL, Mexico, State of Chiapas, Chiapa de Corzo, Río Nandalumi, 16°43'22.1"N, 92°58'19.8"W; UNICACH-MZ-P 5752, 4, 40.6–43.5 mm SL, Mexico, State of Chiapas, Villaflores, Col. Cuauhtemoc, 16°20'45"N, 93°12'42.4"W; UNICACH-MZ-P 6355, 14, 29.7–78.3 mm SL, Mexico, State of Chiapas, Cahahotán, Río Zapata-Puente Col. Emiliano Zapata, 14°59'11.6"N, 92°10'14.4"W.

DATA ACCESSIBILITY

Supplemental material is available at <https://www.ichthyologyandherpetology.org/i2020156>. Unless an alternative copyright or statement noting that a figure is reprinted from a previous source is noted in a figure caption, the published images and illustrations in this article are licensed by the American Society of Ichthyologists and Herpetologists for use if the use includes a citation to the original source (American Society of Ichthyologists and Herpetologists, the DOI of the *Ichthyology & Herpetology* article, and any individual image credits listed in the figure caption) in accordance with the Creative Commons Attribution CC BY License. ZooBank publication urn:lsid:zoobank.org:pub:8CA6113D-7466-4EF2-91BD-C141091E5771.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was conducted as part of the doctoral studies of S. E. Domínguez-Cisneros. We are thankful to technicians and students of the Museo de Zoología and the Biogeography lab at UNICACH that participated in fieldwork, lab work, and map preparation. SED-C expresses special thanks to G. Solís-Guzmán and O. Domínguez Domínguez from the Aquatic Biology Laboratory at UMSNH for support with molecular

procedures and to R. Hernandez-Sanchez, director of the Instituto de Ciencias Biológicas at UNICACH, for continued support for this research. We thank personnel at SAGARPA for issuing collecting permits in the states of Guerrero, Oaxaca, and Chiapas. Portions of the molecular work were carried out in the Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution at the Field Museum of Natural History, with support from the Pritzker Foundation. CDM thanks the Neogauzee Foundation for their support of his work.

LITERATURE CITED

- Álvarez, J., and J. Carranza. 1951. Descripción de un género y especie nuevos de peces ciprinodontidos procedentes de Chiapas (México). *Ciencia*, Mexico City 11:40–42.
- Cruz-Maza, B. G. A. 2018. Historia de vida y ecología de *Tlaloc hildebrandi* (Miller, 1950) en los altos de Chiapas, México. Unpubl. master's thesis, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.
- Del Moral-Flores, L. F., E. López-Segovia, and T. Hernández-Arellano. 2020. *Profundulus chimalapensis*, una nueva especie de pez ciprinodóntido (Cyprinodontiformes: Profundulidae) del Río Coatzacoalcos, México. *Revista de Biología Tropical* 68:1185–1197.
- Doadrio, I., J. Carmona, E. Martínez, and A. de Sostoa. 1999. Genetic variation and taxonomic analysis of the subgenus *Profundulus*. *Journal of Fish Biology* 55:751–766.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797.
- Garman, S. 1895. The cyprinodonts. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology* 19:1–179.
- GBIF. 2020. Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org> (accessed 10 December 2020).
- Hoedeman, J. J., and F. J. Bronner. 1951. De Orde van de Tandkarpertjes. VI. Cyprinodontiformes Berg, 1940. *Het Aquarium* 1:1–3.
- Hubbs, C. L. 1924. Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 13:1–31.
- Jamangapé, J. A., E. Velázquez-Velázquez, E. Martínez-Ramírez, M. J. Anzueto-Calvo, E. L. Gómez, S. E. Domínguez-Cisneros, C. D. McMahan, and W. A. Matamoros. 2016. Validity and redescription of *Profundulus balsanus* Ahl, 1935 (Cyprinodontiformes: Profundulidae). *Zootaxa* 4173:55–65.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.
- Matamoros, W. A., S. E. Domínguez-Cisneros, E. Velázquez-Velázquez, and C. D. McMahan. 2018. Description of a new species of killifish of the genus *Profundulus* (Atherinomorpha: Profundulidae) from the Mexican state of Oaxaca. *Copeia* 106:239–246.
- Matamoros, W. A., J. F. Schaefer, C. Hernández, and P. Chakrabarty. 2012. *Profundulus kreiseri*, a new species of Profundulidae (Teleostei, Cyprinodontiformes) from northwestern Honduras. *ZooKeys* 227:49–62.
- McMahan, C. D., W. A. Matamoros, F. S. Álvarez Calderón, W. Y. Henríquez, H. M. Recinos, P. Chakrabarty, E. Barraza, and N. Herrera. 2013. Checklist of the inland fishes of El Salvador. *Zootaxa* 3608:440–456.
- Miller, R. R. 1948. The cyprinodont fishes of the Death Valley system of eastern California and southwestern Nevada. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 68:1–155.
- Miller, R. R. 1955. A systematic review of the Middle American fishes of the genus *Profundulus*. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 92:1–64.
- Morcillo, E., C. P. Ornelas-García, L. Alcaraz, W. A. Matamoros, and I. Doadrio. 2016. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the Mesoamerican endemic freshwater fish family Profundulidae (Cyprinodontiformes: Actinopterygii). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94:242–251.
- Myers, G. S. 1938. Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. *Annual Report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution* 92:339–364.
- Ornelas-García, C. P., O. Domínguez-Domínguez, and I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology* 8:340.
- Ornelas-García, C. P., E. Martínez-Ramírez, and I. Doadrio. 2015. A new species of killifish of the family Profundulidae from the highlands of the Mixteca region, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:926–933.
- Parenti, L. R. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiformes fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 168:335–557.
- Rambaut, A., A. J. Drummond, D. Xie, G. Baele, and M. A. Suchard. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67:901–904.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539–542.
- Sabaj, M. H. 2020. Codes for natural history collections in ichthyology and herpetology. *Copeia* 108:593–669.
- Smith, G. R., C. Badgley, T. P. Eiting, and P. S. Larson. 2010. Species diversity gradients in relation to geological history in North American freshwater fishes. *Evolutionary Ecology Research* 12:693–726.

IX. CAPITULO III

FILOGENIA DE LA FAMILIA PROFUNDULIDAE

**Filogenia molecular de la familia Profundulidae (Actinopterygii: Cyprinodontiformes),
peces endémicos de Mesoamérica.**

Sara E. Domínguez-Cisneros, Omar Domínguez Domínguez, Rosa Gabriela Beltrán López,
Rodolfo Pérez-Rodríguez y Ernesto Velázquez-Velázquez.

En preparación para Revista de **Biología Tropical**, 2023

Filogenia molecular de la familia Profundulidae (Actinopterygii: Cyprinodontiformes), peces endémicos de Mesoamérica

Sara E. Domínguez-Cisneros^{1*}, <https://orcid.org/0000-0003-1707-2556>

Omar Domínguez Domínguez², <https://orcid.org/0000-0001-9583-4443>

Rosa Gabriela Beltrán López³, <https://orcid.org/0000-0001-8955-7603>

Rodolfo Pérez-Rodríguez², <https://orcid.org/0000-0002-0822-4610>

Ernesto Velázquez-Velázquez⁴, <https://orcid.org/0000-0003-1884-0502>

1. Doctorado en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte, 1150, Col. Lajas Maciel, 29029 Tuxtla Gutiérrez, CHIS, México; sara.dominguez@unicach.mx (*autor de correspondencia)

2. Laboratorio de Biología Acuática, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio “R” planta baja, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mujica S/N, 58030 Morelia, MEX, México; goodeido@yahoo.com.mx; rperezr38@gmail.com.

3. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca, Morelos, México; rosa.beltran@uaem.mx

4. Colección de Peces, Museo de Zoología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte, 1150, Col. Lajas Maciel, 29029 Tuxtla Gutiérrez, CHIS, México. ernesto.velazquez@unicach.mx

RESUMEN

Introducción: La familia Profundulidae es un linaje con una distribución geográfica restringida y endémica de Mesoamérica, la cual incluye dos géneros y 13 especies nominales. Las últimas dos hipótesis filogenéticas, a pesar de no haber incluido todas las especies de ambos géneros, ni contado con una buena representación del ámbito de distribución geográfica de las especies, encontraron hallazgos importantes que derivaron en el incremento en el número de especies para la familia. **Objetivo:** En este estudio investigamos las relaciones filogenéticas de la familia Profundulidae ampliando el muestreo taxonómico y completando el ámbito de distribución de varios taxones, con el propósito de validar la propuesta taxonómica actual y evidenciar la presencia de nuevos linajes. **Método:** Utilizamos las aproximaciones de inferencia bayesiana (IB) y de Máxima Verosimilitud (MV) para inferir la filogenia molecular basada en el gen

mitocondrial ND2 (1047 pb) de las 13 especies reconocidas actualmente para la familia Profundulidae. **Resultados:** Con una marcada divergencia molecular del 21.1% recuperamos a los dos únicos géneros de la familia Profundulidae (*Tlaloc* y *Profundulus*) como grupos naturales. De las 9 especies reconocidas para *Profundulus* y 4 especies reconocidas para *Taloc*, se recuperaron 7 y 3 respectivamente, además de 3 linajes bien diferenciados; entre otras implicaciones, se sugiere la sinonimización de algunos taxa, así como la amplitud del rango de distribución geográfica de otros. **Conclusiones:** Los resultados tienen implicaciones taxonómicas relevantes en Profundulidae, tanto en la existencia de posibles nuevas especies como en la posible existencia de sinonimias. En algunas especies su ámbito de distribución se amplía. Por lo que sugerimos llevar a cabo más estudios que permitan resolver la taxonomía a nivel específico, particularmente en el género *Profundulus*, donde se registró el mayor número de linajes evolutivos independientes.

Palabras clave: Filogenia, profundúlidos, análisis molecular, peces endémicos.

INTRODUCCIÓN

La familia Profundulidae está representada por peces de agua dulce endémicos de Mesoamérica, donde la mayoría de los sistemas de agua dulce hospedan uno o más miembros de esta familia. Aunque la familia tiene una distribución mesoamericana, su mayor diversidad ocurre en el sur de México (Miller, 2009; Morcillo *et al.*, 2016). La familia es también una de las menos diversas dentro del orden Cyprinodontiformes, con trece especies descritas, en comparación con las 353 especies nominales en Poeciliidae (Nelson, 2016, Domínguez-Cisneros *et al.*, 2023).

La familia Profundulidae fue propuesta por Hoedeman and Bronner en 1951, con un solo género nominal (*Profundulus* Hubbs, 1924); la cual fue reconocida como un grupo natural por Parenti (1981) y Costa (1998) con base en una serie de sinapomorfías, principalmente osteológicas.

Con la primera hipótesis filogenética de Profundulidae se erigieron los dos géneros actuales dentro de la familia (*Tlaloc* Álvarez y Carranza 1951, y *Profundulus* Hubbs, 1924) basados en datos moleculares (mtDNA y nDNA), por Morcillo *et al.* (2016). Con la reclasificación de *Profundulus* en dos géneros (*Profundulus* y *Tlaloc*), ambos taxones fueron recientemente redescritos y diagnosticados por Domínguez-Cisneros *et al.* (2023), basados en caracteres morfológicos. Morcillo *et al.* (2016), propusieron una hipótesis taxonómica con dos modelos de diversidad de especies dentro de la familia Profundulidae: un modelo conservador de ocho especies y un modelo de mayor diversidad de especies (12 especies).

Recientemente se han propuesto nuevos linajes, la mayoría mediante estudios moleculares, que han sido descritas como nuevas especies (*P. mixtlanensis*, *P. parentiae*, *P. chimalapensis*, *P. adani*, *P. emilioi* y *P. rei*) (Ornelas *et al.*, 2016; Matamoros *et al.*, 2018; Del Moral-Flores *et al.*, 2020; Domínguez-Cisneros *et al.*, 2021; Calixto-Rojas *et al.*, 2023), lo que genera la necesidad de incluir estos nuevos taxa en la hipótesis filogenética de la familia para poner a prueba la validación de estas especies. Por lo que el propósito de este estudio es reconstruir la filogenia de la familia Profundulidae con base en datos moleculares obtenidos previamente (utilizando un

marcador mitocondrial ND2) e incorporando localidades geográficas no incluidas en trabajos previos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material utilizado en este estudio se muestra en la Tabla 1. La mayor parte del material utilizado (101 muestras) provienen de la Colección de Peces (colección accesoria de tejidos) del Museo de Zoología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (CT-UNICACH) (código de colección 1163, Sabaj, 2020). Algunas muestras de tejido fueron obtenidas gracias a la colaboración con la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CPUM-UMSNH). Las muestras de tejidos son de las 13 especies nominales, de los dos únicos géneros (*Tlaloc* y *Profundulus*) de la familia Profundulidae (Nelson, 2016; Morcillo *et al.*, 2016; Domínguez-Cisneros *et al.*, 2023) y provienen de 62 localidades del Sur de México (Chiapas, Oaxaca y Guerrero) y Centroamérica (Honduras y Guatemala). Siempre que fue posible, se incluyeron al menos dos tejidos por localidad (Fig. 1, Tabla 1).

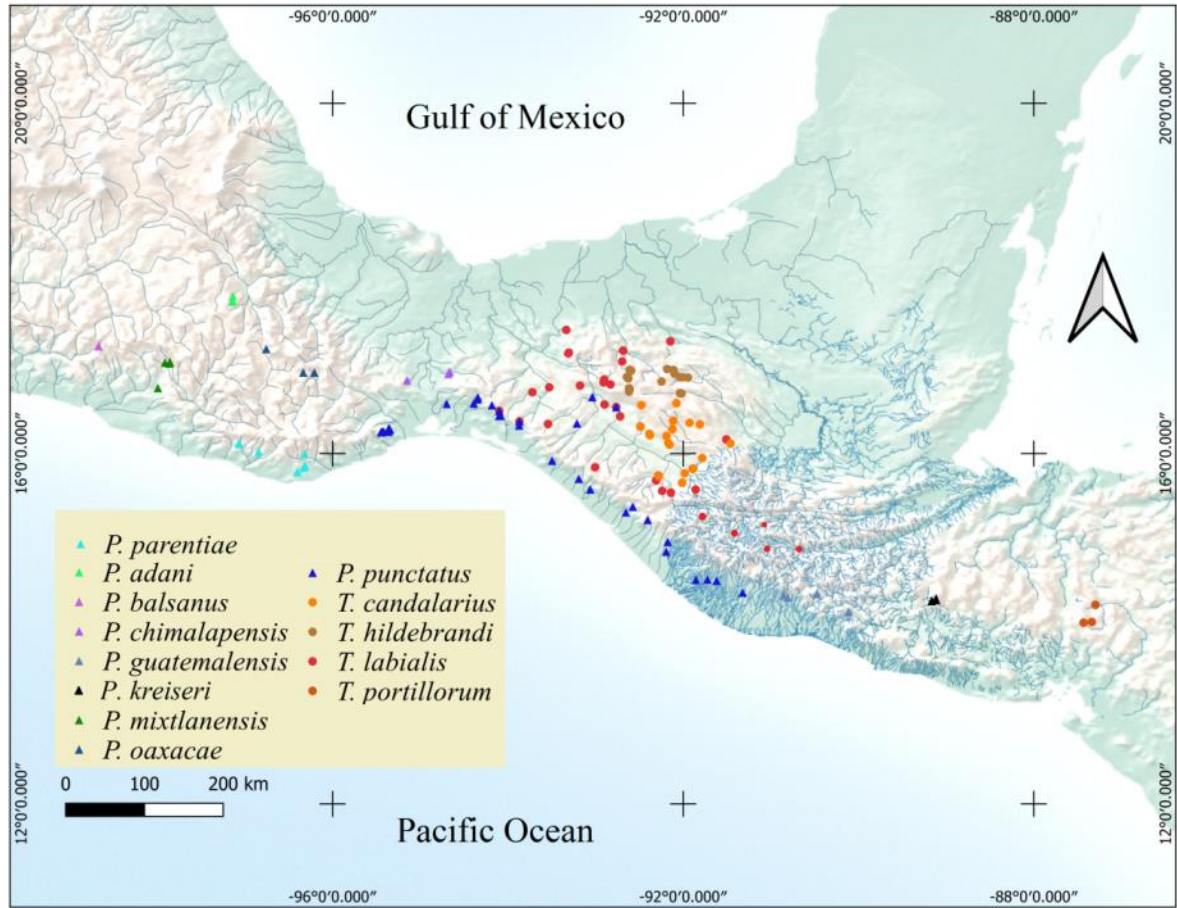


Fig. 1. Localidades del material de estudio de las especies de la familia Profundulidae; sur de México y Centroamérica.

Tabla 1. Especies reconocidas, localidades y secuencias del gen mitocondrial ND2 de la familia Profundulidae. País: México (M), Guatemala (G), Honduras (H). * (muestras de éste estudio), CPUM-UMSNH (UM). Las secuencias de GenBank con las iniciales de acceso KJ y ET.

| N | ESPECIE | LOCALIDAD | ESTADO/PAIS | # TEJIDO/ SECUENCIA |
|----|--------------------------------|---|--------------|------------------------------|
| 1* | <i>P. parentiae</i> | Río Huatulco, Santa María Huatulco, | Oaxaca (M) | 212 |
| | | Arroyo Figueroa, Colonia San Miguel Figueroa, | | |
| 3* | <i>P. parentiae</i> | Pochutla | Oaxaca (M) | 229, 230, 231 |
| 2* | <i>P. parentiae</i> | Río la Loma, Santa María Colotepec | Oaxaca (M) | 250, 251 |
| 3* | <i>P. parentiae</i> | Santa María Magdalena Piñas, Pluma Hidalgo | Oaxaca (M) | UM65298, 65301, 65302 |
| 3* | <i>P. balsanus</i> | Río Malinaltepec, Chilpancingo | Guerrero (M) | 366, 367, 368 |
| 1 | <i>P. balsanus</i> | Río Malinaltepec, Papagayo | Guerrero (M) | KJ878764 |
| 1 | <i>P. balsanus</i> | Río Nopala, Manialtepec, Manialtepec | Oaxaca (M) | KJ878763 |
| 1 | <i>P. balsanus</i> | Río Colotepec, Colotepec, San Gabriel Mixtepec | Oaxaca (M) | KJ878761 |
| 1 | <i>P. balsanus</i> | Río Coyul, Coyul, Santa María Huatulco | Oaxaca (M) | KJ878762 |
| | <i>P. balsanus</i> (<i>P.</i> | | | |
| 1 | <i>emilioi</i>) | Río Cumiapa, Quetzala, El Zapote Santa María | Oaxaca (M) | KJ878786 |
| 1 | <i>P. balsanus</i> | Río Huachimil, Papagayo, Tlahuizapa | Guerrero (M) | KJ878765 |
| 1* | <i>P. guatemalensis</i> | Río cantil, Escuintla | G | 2705 |
| 1 | <i>P. guatemalensis</i> | Río Blanco, Guacalate, Guacalate Sacatepequez | G | KJ878766 |
| 1* | <i>P. guatemalensis</i> | Río Las Marias, Santa Rosa Oratorio | G | 2720 |
| 1* | <i>P. kreiseri</i> | Río Selegua el Carrizo, Huehuetenango | G | 2799 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río Grande Acacoyagua, Tuxtla Chico | Chiapas (M) | 2915 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Arroyo tributario Río Pijjiapan, Pijjiapan | Chiapas(M) | 1287 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río Margaritas Puente, Pijjiapan | Chiapas (M) | 10079 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río Cintalapa, Escuintla | Chiapas (M) | 1344 |
| 2* | <i>P. punctatus</i> | Río Zapata, Cacahoatán | Chiapas (M) | 1369, 1371 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río Huixtla, Huixtla | Chiapas (M) | 10083 |
| 1 | <i>P. punctatus</i> | Río Toliman, Toliman, Belizario Domínguez | Chiapas (M) | KJ878767 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río Alil- Puente Alil, Retal húleu | G | 2682 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río el Puentecito, Retal húleu | G | 2688 |
| 1 | <i>P. punctatus</i> | Río Bravo, Bravo, Finca Moca, Suchitepequez | G | KJ878768 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | San Isidro Chacalapa, San Pedro Huamelula | Oaxaca (M) | UM65293 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Río las salinas, Santa María Albarrada | Oaxaca (M) | UM65260 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | San Baltazar, Chichicapan | Oaxaca (M) | UM65261 |
| 2 | <i>P. punctatus</i> | Río Chacalapa, Chacalapa, San Isidro Chacalapa | Oaxaca (M) | KJ878756, KJ878757 |
| 3 | <i>P. punctatus</i> | Río de los Perros, Tehuantepec, La Primavera | Oaxaca (M) | KJ878758, KJ878759, KJ878760 |
| 1 | <i>P. punctatus</i> | Río Novillero, Novillero, Las Minas | Oaxaca (M) | KJ878769 |
| 4* | <i>P. punctatus</i> | Las Cruces, Santo Domingo Tehuantepec | Oaxaca (M) | UM66534, 66535, 66538, 66540 |
| 2* | <i>P. punctatus</i> | Arroyo las Láminas, Santo Domingo Tehuantepec | Oaxaca (M) | UM66498, 66499 |
| 2* | <i>P. punctatus</i> | La Cristalina, San Miguel Chimalapa | Oaxaca (M) | UM66437, 66467 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Nacimiento del Río Novillero, Grijalva, Cintalapa | Chiapas (M) | 3028 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Arroyo del Rancho Sauce, Grijalva, Villaflores | Chiapas (M) | 119 |
| 1* | <i>P. punctatus</i> | Arroyo Rizo de Oro, Grijalva, Cintalapa | Chiapas (M) | 2974 |
| 2* | <i>P. punctatus</i> | Arroyo Rodulfo Figueroa, Grijalva, Cintalapa | Chiapas (M) | 2982, 2983 |

| | | | | |
|-----|--|--|-------------|-------------------------------|
| 1 | <i>P. punctatus</i> | Río Chiquito, Grijalva, Cintalapa | Chiapas (M) | KJ878770 |
| 1* | <i>P. adani</i> | Arroyo Nodón, Papaloapán, San Miguel Huatla | Oaxaca (M) | 2856 |
| 1* | <i>P. adani</i> | Río Huatla, Papaloapán, San Miguel Huatla | Oaxaca (M) | 2867 |
| 2* | <i>P. mixtlanensis</i> | Río San Isidro, la Soledad Putla | Oaxaca (M) | 417, 419 |
| 2* | <i>P. mixtlanensis</i> (<i>P. rei</i>) | Puente el Platanar, Sta. Ma. Zacatepec | Oaxaca (M) | 470, 471 |
| 2* | <i>P. mixtlanensis</i> | Cascada San Gabriel, Mixtepec | Oaxaca (M) | 498, 499 |
| 1* | <i>P. mixtlanensis</i> | Río del Rancho Flor de Café, Mixtepec | Oaxaca (M) | 502 |
| 1* | <i>P. mixtlanensis</i> | Colonia Nvo. Tenochtitlan Putla | Oaxaca (M) | 435 |
| 2 | <i>P. mixtlanensis</i> | Río Grande, Mixteco-Balsas, Santiago Juxtlahuaca | Oaxaca (M) | KJ878771, KJ878774 |
| 1 | <i>P. mixtlanensis</i> | Río Cucharas, Atoyac, Putla de Guerrero | Oaxaca (M) | KJ878772 |
| 1 | <i>P. mixtlanensis</i> | Chalcatongo Primavera, Atoyac | Oaxaca (M) | KJ878787 |
| 1 | <i>P. mixtlanensis</i> | Aldama Primavera, Atoyac | Oaxaca (M) | KJ878773 |
| 2 | <i>P. mixtlanensis</i> | Santiago Primavera, Atoyac, Yosundua | Oaxaca (M) | KJ878775, KJ878776 |
| 1 | <i>P. oaxacae</i> | Río Chiquito, Mixteco-Balsas, Tlaxiaco | Oaxaca (M) | KJ878753 |
| 1 | <i>P. oaxacae</i> | Primavera Sola de Vega, Atoyac | Oaxaca (M) | KJ878755 |
| 1 | <i>P. oaxaca</i> | Río de las Grutas, Atoyac, San Sebastián | Oaxaca (M) | KJ878754 |
| 2* | <i>P. oaxacae</i> | Río Salado, Mitla | Oaxaca (M) | 395, 397 |
| 1* | <i>P. oaxacae</i> | Río Grande, San Agustín Etla | Oaxaca (M) | UM62041 |
| 1 * | <i>P. chimalapensis</i> | Arroyo la Piedra, Paso Lagartos Sta.Ma Chimalapas | Oaxaca (M) | 3032 |
| 1* | <i>P. chimalapensis</i> | Manantial el Jaboncillo, Sta. Ma. Chimalapas | Oaxaca (M) | 3044 |
| 4* | <i>T. candalarius</i> | Ojo de agua-Tzimol | Chiapas (M) | 112, 113, 114, 115 |
| 6* | <i>T. candalarius</i> | Cenote La Candelaria, Nentón | G | 2950 a 2952, 2954, 2957, 2958 |
| 1* | <i>T. candalarius</i> | Colonia Jusnajib, Comitán | Chiapas (M) | 2972 |
| 1* | <i>T. hildebrandi</i> | Colonia Yitic, San Juan Chamula | Chiapas (M) | 21 |
| 1* | <i>T. hildebrandi</i> | El Corralito - Oxchuc | Chiapas (M) | 31 |
| 2* | <i>T. hildebrandi</i> | Río Chanal-Tzaconejá, Usumacinta, Chanal | Chiapas (M) | 2159, 2160 |
| 1* | <i>T. hildebrandi</i> | Río Tzaconejá, Usumacinta, Altamirano | Chiapas (M) | 2167 |
| 2* | <i>T. hildebrandi</i> | Colonia Chalchihuitan, Chalchihuitan | Chiapas (M) | 2383, 2385 |
| 1* | <i>T. hildebrandi</i> | Balneario Las Lajas, Ocosingo | Chiapas (M) | 179 |
| 2 | <i>T. hildebrandi</i> | La Virgen, Grijalva-Usumacinta, Ocosingo | Chiapas (M) | KJ878777, KJ878778 |
| 1 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Peje de Oro, Grijalva | Chiapas (M) | KJ878779 |
| 3 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Tzaconejá, Usumacinta | Chiapas (M) | ET2630, 2616, 2615 |
| 3 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Tzaconejá, Usumacinta | Chiapas (M) | ET2598,2596,2593 |
| 2 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Chenalhó, Grijalva, Chenalhó | Chiapas (M) | ET2540, ET2536 |
| 4 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Amarillo, Grijalva, San Cristóbal de las Casas | Chiapas (M) | ET2507, 2508,2509,2510 |
| 1 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Amarillo, Grijalva, San Cristóbal de las Casas | Chiapas (M) | ET2523 |
| 1 | <i>T. hildebrandi</i> | Río Amarillo, Grijalva, San Cristóbal de las Casas | Chiapas (M) | ET2499 |
| 3* | <i>T. labialis</i> | Arroyo la chacona, Grijalva, Tuxtla Gutiérrez | Chiapas (M) | 123, 124, 138 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | El Mangal, Grijalva, Socoltenango | Chiapas (M) | 121 |
| 2* | <i>T. labialis</i> | La Pochota, Grijalva, Socoltenango | Chiapas (M) | 1685, 1687 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río ojo de agua, Grijalva, Chiapa de Corzo | Chiapas (M) | 156 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río La Venta - El Aguacero, Grijalva, Ocozocoautla | Chiapas (M) | 548 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río Chabajebal, Chabajebal | Chiapas (M) | 1013 |

| | | | | |
|-----|-----------------------|--|-------------|------------------|
| 3* | <i>T. labialis</i> | Río Blanco, Grijalva, Venustiano Carranza | Chiapas (M) | 1141, 1153, 1673 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río Zapata, Bella Vista | Chiapas (M) | 1812 |
| 2* | <i>T. labialis</i> | Río Yayahuita, Grijalva-Usumacinta, Chicomuselo | Chiapas (M) | 1753, 1783 |
| 1 | <i>T. labialis</i> | Río Comalatengo, Grijalva-Usumacinta | Chiapas (M) | KJ878785 |
| 1 | <i>T. labialis</i> | Río Nenton, Grijalva-Usumacinta, Huehuetenango | G | KJ878781 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río Selegua, Huehuetan | G | 2791 |
| 2* | <i>T. labialis</i> | Río Hondo, Grijalva, Ixtapa | Chiapas (M) | 2460, 2461 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río Totopac, Grijalva, Tecpatán | Chiapas (M) | 2470 |
| 1* | <i>T. labialis</i> | Río Ostuacan, Grijalva, Ostuacán | Chiapas (M) | 2505 |
| 3* | <i>T. labialis</i> | El Esquinero-Chimalapa, Coatzacoacos, San Miguel | Oaxaca (M) | 3000, 3004, 3020 |
| 1 | <i>T. labialis</i> | Río Jerónimo, Grijalva-Usumacinta, Baja Verapaz | G | KJ878783 |
| 1 | <i>T. labialis</i> | Río Selegua, Grijalva-Usumacinta, Huehuetenango | G | KJ878784 |
| 1 | <i>T. labialis</i> | Río Chihuahua, Grijalva-Usumacinta, Santa Inés | Chiapas (M) | KJ878782 |
| 1 | <i>T. labialis</i> | Río Grande, Grijalva-Usumacinta, Comitán | Chiapas (M) | KJ878780 |
| 2* | <i>T. portillorum</i> | Mateo a Lepaterique, Francisco Morazán | H | 2768, 2765 |
| 1 | <i>T. portillorum</i> | Río Canoas Siguatepeque, Ulua, Comayagua | H | KJ878788 |
| 1 | <i>T. portillorum</i> | Río Nacaome, Nacaome, Francisco Morazán | H | KJ878789 |
| 154 | | 98 | | |

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación. El ADN fue extraído de la aleta pectoral y/o caudal con el método de extracción proteinasa K/fenol/cloroformo de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Debido a la existencia de secuencias para las especies y linajes de la Familia en estudio (Morcillo *et al.*, 2016), se realizó la amplificación y secuenciación del gen mitocondrial ND2 (1047 pb). La amplificación se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el primers Dist f 5' AGCTTTTGGGCCCATACCCCA 3' y Distr 5' AGGRACTAGGAGATTTTCACTCCTGCT 3' presentados en Arroyave *et al.* (2013); bajo las siguientes condiciones: (95 °C/60s, 58 °C/60s, 72 °C/120s) x 35 ciclos de amplificación. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos bajo Sybr-Safe para ser visualizados a través de luz ultravioleta. Los productos fueron enviados para su secuenciación al laboratorio genómico MacroGen en Seoul, Corea del Sur.

Alineamiento de secuencias. Todas las secuencias obtenidas fueron revisadas por medio de los cromatogramas y alineadas manualmente mediante el software MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Se adicionaron secuencias (obtenidas de GenBank) de algunas especies de la familia

Profundulidae de los trabajos: Beltrán-López *et al.* 2021 (15 secuencias) y Morcillo *et al.* 2016 (39 secuencias), incluyendo en este último, las secuencias del grupo externo (outgroup) de las especies *Fundulus heteroclitus* y *Neotoca bilineata* de las familias Fundulidae y Goodeidae, respectivamente.

Análisis filogenético. Para la reconstrucción de la hipótesis filogenética utilizamos los métodos de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Para evaluar el grado de divergencia, la distancia genética no corregida (*p*-distancia) fue calculada entre las especies y clados con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). La selección de modelos de evolución de nucleótidos se realizó en el programa jModelTest (Posada, 2008) bajo el criterio de información de Akaike (AIC). El árbol de MV fue calculado con el programa RAxML (Stamatakis, 2014) usando el modelo de sustitución GTR+GAMMA y aplicando 1000 réplicas de bootstrap. El árbol de IB fue calculado con el programa MrBayes v.3.2 (Ronquist *et al.*, 2011), usando el modelo de sustitución GTR+G y los parámetros: nst=6, rates=gamma, cuatro cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), por 10 millones de generaciones con muestreos cada 1000 generaciones, para obtener el árbol consenso realizamos un burn-in del 10%. Para la visualización y edición de los árboles utilizamos el Programa FigTree v.1.4 (Rambaut, 2009).

RESULTADOS

El alineamiento final del gen mitocondrial ND2 para las 13 especies de la familia Profundulidae comprendió 156 secuencias (1047 pb) de 98 localidades del sur de México y Centro América. En éste estudio se adicionan 102 secuencias de 61 localidades nuevas. Los datos de todas las secuencias utilizadas se ofrecen en la Tabla 1.

Relaciones Filogenética. Los árboles obtenidos de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) se recuperaron casi resueltos en su totalidad con la misma topología y soportes altos para la mayoría de los nodos (Figs. 2 y 3). Ambos géneros de la familia Profundulidae, *Profundulus* y *Tlaloc*, fueron altamente soportados como monofiléticos con ambos métodos

(Figs. 2 y 3), entre los cuales hay una notable divergencia molecular de 21.1% de distancias no corregidas.

El árbol con ambos métodos presentó 15 clados soportados, 12 dentro de *Profundulus* y tres en el género *Tlaloc* (Fig. 2). De los 12 clados del género *Profundulus*, a excepción de *P. kreiseri*, *P. mixtlanensis* y *P. adani*, el resto se soportan como grupos monofiléticos (Fig. 2). En el caso de *P. kreiseri*, debido a que se incluyó una sola secuencia, no se pudo poner a prueba su monofilia; no obstante, presenta una posición filogenética que la ubica, sin conflicto alguno, como especie hermana de *P. guatemalensis* (Fig. 2). *Profundulus mixtlanensis* es parafiletico debido a que dentro de este se incluye *P. adani* (Fig. 2). En el género *Tlaloc* se recuperaron los siguientes clados: el correspondiente a *T. portillorum* que divergió primero, seguido de un clado formado por *T. hildebrandi* que es hermano del clado formado por *T. candalarius*+*T. labialis* (Fig. 2).

Además de especies reconocidas, particularmente dentro del género *Profundulus* se recuperaron tres clados bien soportados (*P. sp.* "Quetzala", *P. aff. balsanus* y *P. sp.* "Gri-Teh" con distancia del 4.06% al 6.22%, cuyo rango se ubica entre las distancias genéticas para pares de especies bien reconocidas (Tabla 2). La distancia-p mínima entre especies reconocidas y linajes bien diferenciados fue de 3.78% y se registró entre las especies *P. guatemalensis* y *P. kreiseri*; mientras que las distancias máximas dentro de cada uno de los géneros, fue de 16.94% entre *P. chimalapensis* y *P. adani*, y 10.03% entre *T. portillorum* y *T. labialis* (Tabla 2).

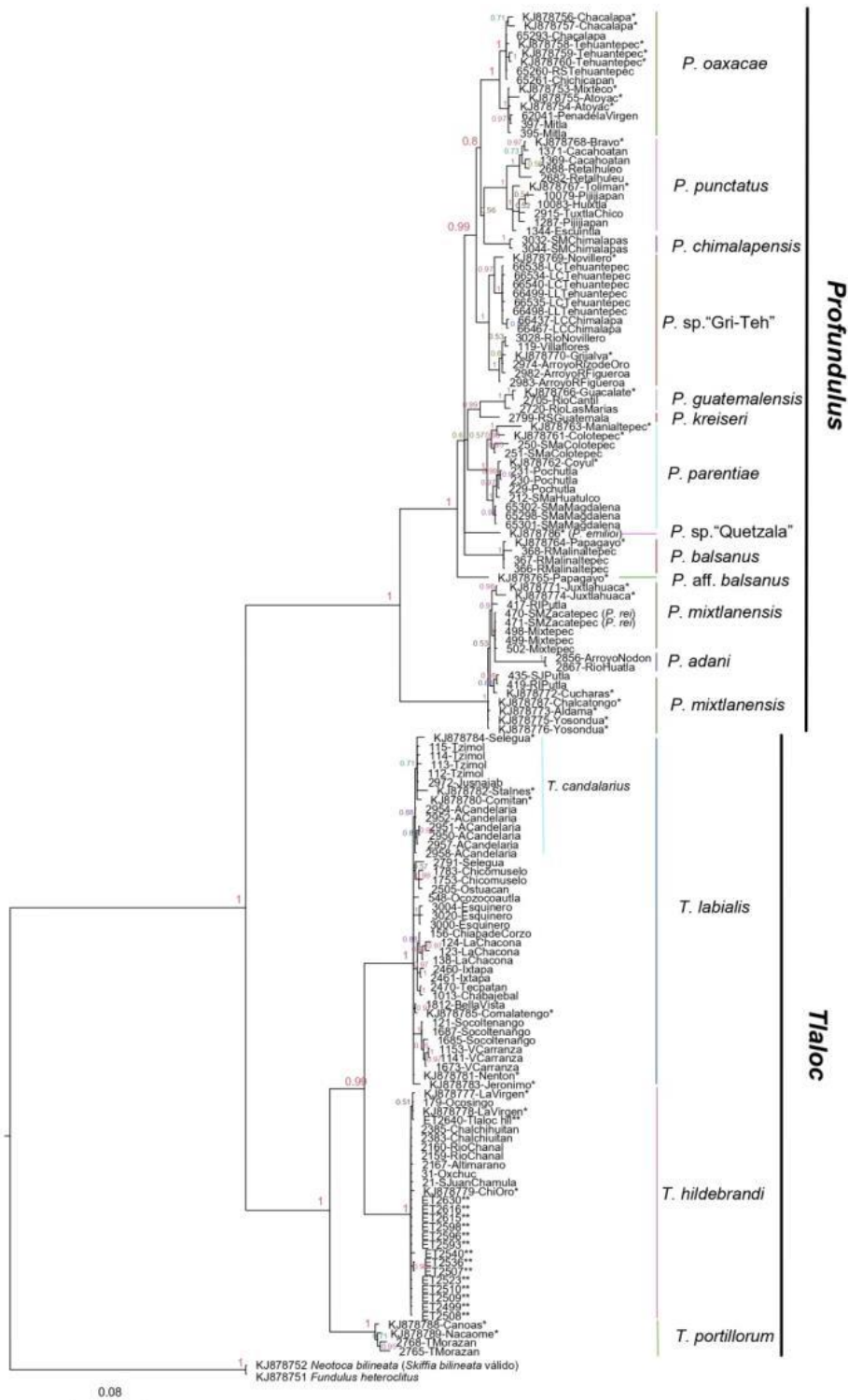


Figura 2. Árbol de Inferencia Bayesiana con el marcador ND2. En la parte superior de las ramas se muestran los valores de probabilidad posterior. Los asteriscos (* y **) representan secuencias publicadas en Morcillo et al. (2016) y Beltrán-López et al. (2021), respectivamente.

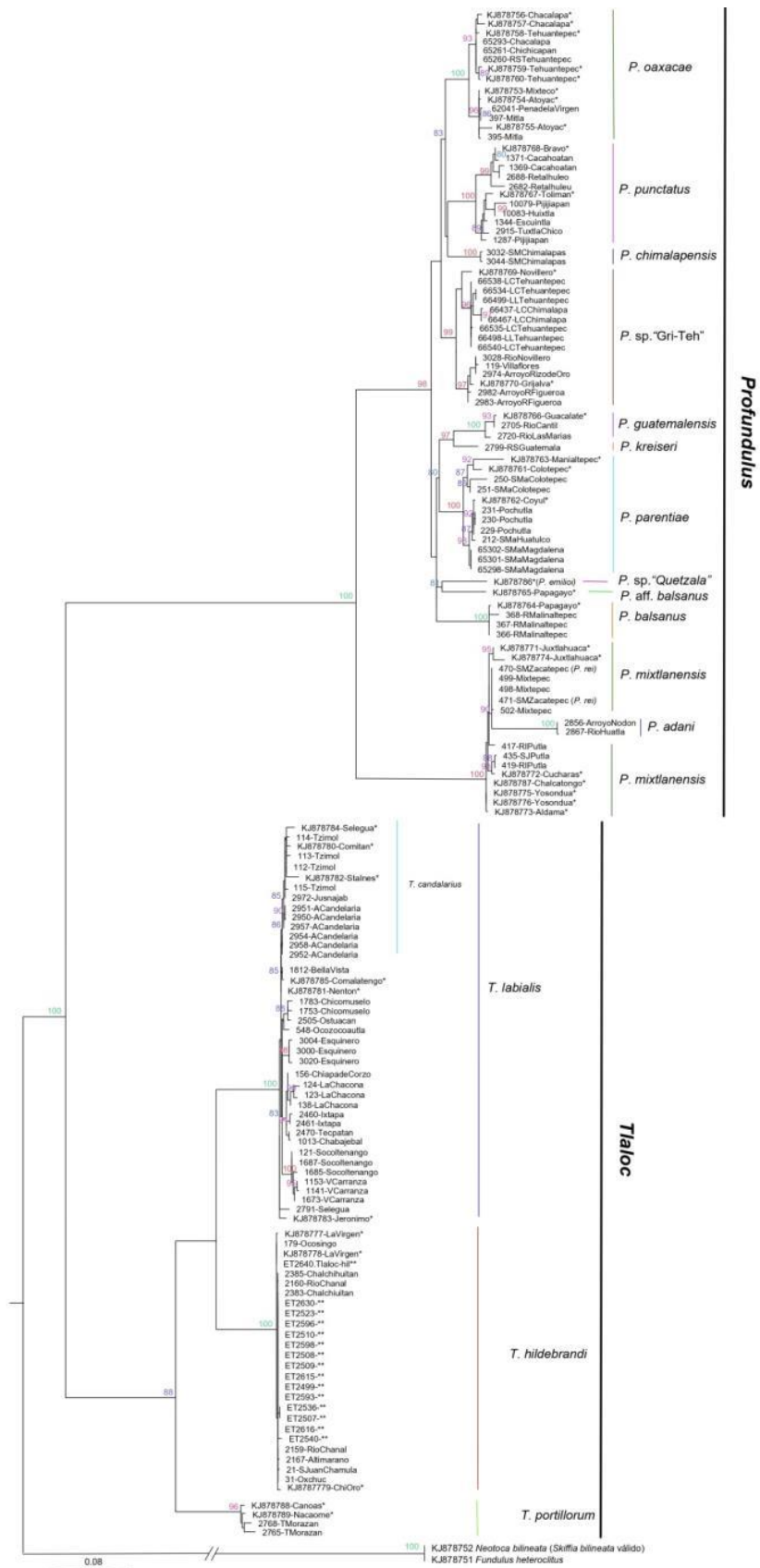


Figura 3. Árbol de Máxima Verosimilitud para el marcador ND2. En la parte superior de las ramas se muestran los valores de Bootstrap. Los asteriscos (* y **) representan secuencias publicadas en Morcillo et al. (2016) y Beltrán-López et al. (2021), respectivamente.

Tabla 2. Distancias genéticas (*p-distancia*) entre las especies y linajes de la Familia Profundulidae, basada en el gen mtND2.

| Especies/UTE | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 <i>T. portillorum</i> | --- | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 <i>T. labialis</i> | 10.033 | --- | | | | | | | | | | | | | |
| 3 <i>T. hildebandi</i> | 9.729 | 8.062 | --- | | | | | | | | | | | | |
| 4 <i>P. oaxacae</i> | 21.566 | 22.703 | 21.15 | --- | | | | | | | | | | | |
| 5 <i>P. mixtlanensis</i> | 21.298 | 23.504 | 22.281 | 12.674 | --- | | | | | | | | | | |
| 6 <i>P. guatemalensis</i> | 20.699 | 21.839 | 20.081 | 5.807 | 12.023 | --- | | | | | | | | | |
| 7 <i>P. kreiseri</i> | 21.011 | 21.744 | 20.587 | 5.020 | 11.957 | 3.788 | --- | | | | | | | | |
| 8 <i>P. sp. "Quetzala"</i> | 21.618 | 21.746 | 20.894 | 6.224 | 12.849 | 6.129 | 5.253 | --- | | | | | | | |
| 9 <i>P. aff. balsanus</i> | 20.271 | 21.191 | 19.55 | 6.156 | 12.665 | 5.703 | 5.062 | 5.158 | --- | | | | | | |
| 10 <i>P. balsanus</i> | 21.6 | 22.976 | 20.774 | 6.208 | 13.432 | 6.329 | 5.664 | 6.022 | 5.985 | --- | | | | | |
| 11 <i>P. parentiae</i> | 21.685 | 22.367 | 21.06 | 5.160 | 13.218 | 5.307 | 4.655 | 5.112 | 5.178 | 5.045 | --- | | | | |
| 12 <i>P. sp. "Gri-Teh"</i> | 21.618 | 22.402 | 21.098 | 4.060 | 12.762 | 5.706 | 4.679 | 5.746 | 5.708 | 6.249 | 5.294 | --- | | | |
| 13 <i>P. punctatus</i> | 20.976 | 22.083 | 20.024 | 4.778 | 13.093 | 5.981 | 5.806 | 5.809 | 5.591 | 6.455 | 5.686 | 4.565 | --- | | |
| 14 <i>P. chimalapensis</i> | 21.626 | 22.251 | 21.164 | 4.481 | 13.096 | 6.328 | 5.343 | 5.653 | 5.188 | 6.051 | 5.606 | 4.092 | 4.610 | --- | |
| 15 <i>P. adani</i> | 24.325 | 25.979 | 25.172 | 15.989 | 4.459 | 14.406 | 15.437 | 16.408 | 16.408 | 16.57 | 16.912 | 15.323 | 15.901 | 16.937 | --- |

DISCUSIÓN

El presente estudio es congruente con los recientes análisis de la familia Profundulidae (cf. Morcillo *et al.*, 2016; Calixto *et al.*, 2021), donde se corrobora la monofilia de los géneros *Tlaloc* y *Profundulus*. Basado en la divergencia genética registrada en este estudio, así como el grado de diferenciación morfológica entre los géneros recientemente descrita por Domínguez-Cisneros *et al.* (2023), es coincidente también en que los géneros *Profundulus* y *Tlaloc* representan dos clados naturales. Así mismo se reconoce la existencia de 15 linajes distintivos dentro de la familia, tres linajes dentro del género *Tlaloc*, que coinciden con tres de las cuatro especies actualmente reconocidas (*T. portillorum*, *T. hildebrandi*, *T. labialis*), excepto *T. candalarius*; mientras que en *Profundulus*, fueron 12 linajes evolutivos, de los cuales siete de estos linajes son especies reconocidas actualmente (*P. punctatus*, *P. balsanus*, *P. guatemalensis*, *P. kreiseri*, *P. oaxacae*, *P. parentiae*, *P. chiamalapensis*); mientras que *P. adani* y *P. mixtlanensis* no fueron grupos monofiléticos; además se reconocen tres linajes distintivos que representan posibles nuevas especies.

Implicaciones taxonómicas:

La distancia genética entre *P. adani* y *P. mixtlanensis* fue del 4.46% (mtDNA, *p*-distancias); este valor se encuentra dentro del rango para la mayoría de las especies reconocidas dentro de la familia Profundulidae (3.78-6.33 % *p*-distancias). Estudios recientes (Calixto-Rojas *et al.*, 2023), con base en secuencias genéticas (mtDNA y nDNA), datos morfológicos, ambientales y biogeográficos coinciden en señalar a *P. adani* como un taxón no natural. Por lo que se recomienda aumentar y ampliar el muestreo, que no solo se incluya localidades tipo (particularmente de *P. adani*), sino también localidades contiguas dentro de su distribución, que permitan dilucidar la validez de *P. adani*, utilizando además estudios morfológicos-osteológicos.

Tres linajes fueron distintivos y diferenciados de las especies reconocidas en el género *Profundulus*, lo que podrían representar posibles especies nuevas, aquí referidas como *P. sp.*

“Quetzala”; *P. aff. balsanus* y *P. sp. “Gri-Teh”*. Recientemente fueron descritas dos especies nuevas dentro de la familia Profundulidae, *P. emilioi* y *P. rei* (Calixto-Rojas *et al.*, 2023); la localidad tipo de *P. emilioi* es un arroyo localizado a 1 km al sur de la comunidad de San Juan Cacahuatpec, Oaxaca, México; el cual se ubica en la parte media de la cuenca del río Ometepec; en esta misma cuenca, y solamente separados por aproximadamente 20 km, ocurre la especie referida en este estudio como *Profundulus sp. “Quetzala”*. En la descripción de *P. emilioi* de Calixto-Rojas *et al.* (2023) se utilizó una de las secuencias referidas en este trabajo como *Profundulus sp. “Quetzala”*, por lo que sin duda alguna, este linaje representa a *Profundulus emilioi*. Por otro lado, *Profundulus rei* fue descrito con ejemplares de arroyos localizados al sur de la comunidad de Santa María Zacatepec, Oaxaca, el material genético utilizado en la descripción de esta nueva especie incluye una secuencia del gen ND2 del GenBank; los resultados de la filogenia molecular del presente estudio ubican al material de Zacatepec dentro del clado de *P. mixtlanensis*; por lo que la situación taxonómica de *P. rei* necesita de análisis moleculares y morfológicos complementarios para resolver su situación taxonómica.

Estos análisis confirman la hipótesis planteada sobre la existencia de una mayor diversidad de especies en Profundulidae, particularmente en el género *Profundulus*, lo cual coincide con la hipótesis de Morcillo *et al.* (2016), quienes postularon la existencia de una mayor diversidad en la familia Profundulidae, que las que en su momento habían sido descritas y reconocidas (8 especies). Doadrio *et al.* (1999), también habían señalado al menos cinco grupos bien diferenciados dentro del grupo “Punctatus” (subgénero *Profundulus*) basado en datos moleculares (aloenzimas), que podrían corresponder a un mayor número de especies dentro del subgénero *Profundulus*.

Por otro lado, dentro del género *Tlaloc*, la validez de la especie *T. candalarius* ha sido cuestionada debido a la poca diferenciación morfológica e inconsistente en relación con su especie hermana *T. labialis* (Gonzalez-Diaz *et al.*, 2005); sin embargo, la falta de resolución

entre estas dos especies (utilizando marcadores mitocondriales y nucleares: mtDNA y nDNA), sugiere una divergencia reciente entre los dos clados (Matamoros *et al.*, 2012; Morcillo *et al.*, 2016). Nuestros análisis, utilizando el marcador mtND2 arrojaron resultados similares, los niveles de diferenciación genética entre estas dos especies nominales fue relativamente baja (Dp = 0,8-0,2% divergencia para ND2). Estudios morfológicos recientes (Domínguez-Cisneros *et al.*, 2023), basados en el análisis de caracteres merísticos, morfométricos y osteológicos, permitieron distinguir a las especies *T. labialis* y *T. candalarius*, la diferenciación morfológica encontrada entre estas dos especies, permite separarlas por un mayor número de elementos vertebrales en *T. labialis* (37 a 38) versus un número menor en *T. candalarius* (33 a 36); por lo que coincidimos en que la poca diferenciación genética registrada entre este complejo de especies, puede deberse a una divergencia reciente entre *T. labialis* y *T. candalarius*; por lo que se sugiere mantener la validez de *T. candalarius*; sin embargo, deberán completarse los estudios utilizando otras herramientas moleculares como la filogeografía, la cual permite el reconocimiento y establecimiento de límites entre especies (Domínguez–Domínguez & Vázquez–Domínguez, 2009) en combinación con estudios morfológicos-osteológicos, que nos permitan dilucidar las relaciones en este complejo de especies.

Implicaciones biogeográficas y rango de distribución:

En la familia Profundulidae observamos especies con diferentes ámbitos de distribución geográfica; mientras que en el género *Tlaloc*, las especies *T. hildebrandi* y *T. portillorum*, presentan ámbitos de distribución muy restringidos (Lyons & Matamoros, 2020; Beltrán-López *et al.*, 2021), *T. labialis* se distribuye en gran parte de los tributarios de la cuenca Grijalva-Usumacinta, desde el centro de Chiapas hasta el sur de Guatemala (Miller, 2005). Como parte de los resultados de este estudio se extendió el ámbito de distribución de *T. labialis* hacia la cuenca alta del río Coatzacoalcos, en San Miguel Chimalapas, Oaxaca. En *Profundulus*, los límites de distribución de las especies no son del todo claro; sin embargo, y como resultado de los análisis

genéticos, la evidencia sugiere que el escamudo oaxaqueño *Profundulus oaxacae*, considerado endémico de la parte alta del río Mixteco y Atoyac, en la vertiente pacífica del estado de Oaxaca (Miller *et al.*, 2005; Maiz-Tome, 2019); amplia notablemente su ámbito de distribución hacia la cuenca del río Tehuantepec, Oaxaca. Miller (2009) señala que la distribución conocida de *P. punctatus* va de las cabeceras del río Coatzacoalcos en Oaxaca y del río Grijalva en Chiapas y Guatemala, en la vertiente Atlántica, mientras que en la vertiente del el Pacífico va desde el río aguacatillo en Guerrero, hasta Santa Rosa Guatemala; sin embargo, los recientes estudios (Morcillo *et al.*, 2016, Calixto-Rojas *et al.*, 2021, 2023, Domínguez-Cisneros *et al.*, 2023) y los resultados de el presente trabajo, coincidimos en señalar que la distribución de *P. punctatus* se restringe a los ríos que drenan a la vertiente del pacífico, entre Chiapas y Guatemala, mientras que el material de las cabeceras del río Coatzacoalcos corresponden a *P. chimalapensis* (Del Moral-Flores *et al.*, 2020). Por otro lado, los registros de Guerrero y Oaxaca, en la vertiente del Pacífico, corresponden a los complejos *P. balsanus*, *P. parentiae*, *P. mixtlanensis* y *P. oaxacae* (Domínguez-Cisneros *et al.*, 2023; Calixto-Rojas *et al.*, 2023). Finalmente, los registros provenientes del Grijalva en Chiapas, incluyendo el material que proviene del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, corresponden a un linaje no descrito, aquí referido como *Profundulus* sp. “Gri-Teh”.

Se ha hipotetizado que la captura de ríos podría ser el proceso que promueve la especiación en esta familia de peces (Morcillo *et al.*, 2016; Matamoros *et al.*, 2018). La captura de ríos es un evento geológico que promueve la generación de riqueza de especies en taxones de agua dulce y ribereños, porque da lugar a especiación alopátrica y a la geodispersión, para facilitar posteriormente la dispersión biótica y el flujo de genes, reduciendo así el riesgo de extinción (Albert *et al.*, 2017).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Esteban Pineda la preparación del mapa y a Manuel Anzueto-Calvo, Fabiola Maza, Gloria Solís por su asistencia técnica en el laboratorio. Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor (SEDC), estudiante de doctorado en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales, de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) México. El Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) apoyo con una beca para estudios de posgrado a la SEDC.

REFERENCIAS

- Álvarez J, Carranza J. 1951. Descripción de un género y especie nuevos de peces Ciprinodontidos procedentes de Chiapas (México). *Ciencia*; 1951; 11(1–2): 40–42
- Albert J, Craig JM, Tagliacollo VA, Petry P. 2017. Upland and Lowland Fishes: A Test of the River Capture Hypothesis. En: Hoorn C, Perrigo A, y Antonelli A (eds) *Mountains, Climate and Biodiversity: A comprehensive and up-to-date synthesis for students and researchers*.
- Beltrán-López RG, González-Díaz AA, Soria-Barreto M, Garduño-Sánchez MA, Xochitla-Castrejón C, Rodiles-Hernández R, Ornelas-García CP. 2021. Genetic diversity and structure of one of the most endangered freshwater fish species in Mexico: *Tlaloc hildebrandi* (Miller, 1950) and recognition of its evolutionarily significant units. *PeerJ* 9:e11952 <https://doi.org/10.7717/peerj.11952>
- Calixto-Rojas M, Lira-Noriega A, Rubio-Godoy M, Pérez-Ponce de León G, Pinacho-Pinacho C. 2021. Phylogenetic relationships and ecological niche conservatism in killifish (Profundulidae) in Mesoamerica. *J Fish Biol*; 2021; 1– 15. <https://doi:10.1111/jfb.14727>
- Costa W. 1998. Phylogeny and classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha) a reappraisal. p. 537±560, In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, and C. A. S. Lucena (eds.). EDIPUCRS (Editora Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, Brazil. 1998.
- Del Moral-Flores LF, López-Segovia E, Hernández-Arellano. 2020. *T. Profundulus chimalapensis*, una nueva especie de pez ciprinodóntido (Cyprinodontiformes: Profundulidae) del Río Coatzacoalcos, México. *Rev Biol Trop*. 2020; 68(4): 1185-1197. <https://doi:10.15517/RBT.V68I4.40340>
- Doadrio I, Carmona J, Martínez E, De Sostoa A. 1999. Genetic variation and taxonomic analysis of the subgenus *Profundulus*. *J Fish Biol*. 1999; 55:751–766. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00715.x>

- Domínguez-Cisneros SE, Velázquez-Velázquez E, McMahan CD, Matamoros WA. 2021. A New Species of Killifish of the Genus *Profundulus* (Atherinomorpha: Profundulidae) from the Upper Reaches of the Papaloapan River in the Mexican State of Oaxaca. *Ichthyol. Herpetol.* 2021; 109(4):949-957. <https://doi.org/10.1643/i2020156>.
- Domínguez-Cisneros SE, Domínguez-Domínguez O, Velázquez-Velázquez E, Pérez-Rodríguez R. 2023. Redescription and diagnoses of the genera *Profundulus* and *Tlaloc* (Cyprinodontiformes: Profundulidae), Mesoamerican endemic fishes. *Neotropical Ichthyology*, 21(1):e220089, 2023
- González-Díaz AA, Díaz-Pardo E, Soria-Barreto M, Martínez-Ramírez E. 2005. Diferencias Osteológicas entre los Subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc* (Teleostei: Profundulidae). *Int J Morphol.* 2014; 32 (3), 1074–1078. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300053>
- Domínguez-Domínguez, O.; Vázquez-Domínguez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1: 59–70.
- Hoedeman JJ, Bronner FJ. De Orde van de tandkarpertjes. VI. Cyprinodontiformes Berg. 1940. *Het Aquarium*; 1951;1:1-3
- Hubbs CL. 1924. Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. *Misc Pubs Univ Michigan Mus Zool.*1924; 13: 1-31
- Lyons, T.J. & Matamoros, W.A. 2020. *Tlaloc portillorum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T125347429A164692340. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T125347429A164692340.en>
- Maiz-Tome, L. 2019. *Profundulus oaxacae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019:e.T191795A2003311.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T191795A2003311.en>
- Matamoros WA, Schaefer JF, Hernández CL, Chakrabarty P. 2012. *Profundulus kreiseri*, a new species of Profundulidae (Teleostei, Cyprinodontiformes) from northwestern Honduras. *ZooKeys*; 2012; 227:49–62. <http://doi:10.3897/zookeys.227.3151>
- Matamoros, W.A., Domínguez-Cisneros, S.E., Velázquez-Velázquez, E., & McMahan, C.D. (2018). Description of a new species of killifish of the genus *Profundulus* (Atherinomorpha: Profundulidae) from the Mexican State of Oaxaca. *Copeia*, 106(2), 239-246.
- Miller R. A Systematic Review of the Middle American fishes of the genus *Profundulus*. *Misc Pubs Univ Michigan Mus Zool.* 1955; 92:1-64. <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/57270>
- Miller R. 2009. Peces dulceacuícolas de México. CONABIO, México D.F. 2009.
- Morcillo FC, Ornelas-García P, Alcaraz L, Matamoros WA, Doadrio I. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the Mesoamerican endemic freshwater fish family Profundulidae (Cyprinodontiformes: Actinopterygii). *Mol Phylogenet Evol.* 2016; 94:242–251. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.002>

- Maryland: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Recuperado el 20 de octubre de 2021, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Nelson, J.S, Grande, T.C, Wilson, M.V.H. 2016. *Fishes of the World*. John Wiley and Sons, Hoboken. 2016.
- Ornelas-García, C.P., Martínez-Ramírez, E., &Doadrio, I. (2015). A new species of killifish of the family Profundulidae from the highlands of the Mixteca region, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 926-933.
- Parenti LR. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bull Am Mus Nat Hist*. 1981; 168 (4): 335-557. <http://hdl.handle.net/2246/438>
- Posada D. 2008. JModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.
- Rambaut, A., 2009. FigTree V1.4 Tree Figure Drawing Tool. Edinburgh.Scotland <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Sajab, H.M. 2020. Codes for Natural History Collections in Ichthyology and Herpetology. *Copeia* 108, No. 2, 2020, 593–669
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T.1989: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Stamatakis, A. 2006. RaxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21). 2688-2690.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., et al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. The Society for Molecular Biology and Evolution, Oxford University, Oxford.
- NIH (National Institutes of Health) (2017). GenBank: GenBank Overview. Bethesda,

X. DISCUSIÓN GENERAL

Durante las últimas décadas la familia Profundulidae ha sido objeto de cambios taxonómicos, donde las hipótesis alternativas propuestas por la morfología (Miller, 1955; González-Díaz *et al.*, 2005) y los datos moleculares (Doadrio *et al.*, 1999, Morcillo *et al.*, 2016), en algunos casos, han producido resultados contrastantes. Los profundúlidos son un grupo taxonómicamente complejo, debido a la similitud morfológica que existe entre los géneros y a la poca variabilidad de los caracteres morfométricos y merísticos que nos permitan la separación de las especies.

En este trabajo, que representa el análisis más completo de la familia Profundulidae, tanto por la representación geográfica de las muestras, como del número de taxa que se analizaron; se generaron nuevos datos morfológicos, osteológicos y moleculares para la familia Profundulidae, que sirvieron de base para la redescrición y diagnóstico de los dos géneros que integran la familia (*Tlaloc* y *Profundulus*); así como para la descripción de una nueva especie dentro del género *Profundulus* (*P. adani*) y la propuesta de una filogenia molecular (basada en un gen mitocondrial), que nos permite generar una hipótesis de relaciones entre las especies y proponer la existencia de posibles nuevos linajes para esta familia de peces; como se analiza en las siguientes secciones.

10. 1. Redescrición y diagnóstico de los géneros *Profundulus* y *Tlaloc*

Los resultados del análisis morfológico-osteológico comparativo revelan y apoyan las relaciones previamente encontradas entre los géneros de la familia Profundulidae, propuestos en análisis moleculares (Morcillo *et al.*, 2016; Calixto-Rojas *et al.*, 2021). El género *Tlaloc* fue erigido por Álvarez y Carranza (1951), basado en la descripción de *Tlaloc mexicanus*; sin embargo, Miller (1955) lo asignó a *Profundulus*, porque el género y especie nominal eran idénticos a *Profundulus labialis*, quedando relegado a nivel de subgénero (Miller, 1955, 2005). Morcillo *et al.* (2016) resucitó el género *Tlaloc* basado en la evidencia molecular (usando genes mitocondriales y nucleares), reconociendo la monofilia del grupo. Con base en los resultados del presente estudio, y derivado de los análisis morfológicos, particularmente de la osteología del cráneo, se corrobora la monofilia del género *Tlaloc*; la cual es soportada por cinco caracteres únicos: 1) el mesetmoides es prominente y de forma oval, sus bordes exceden el margen posterior del vómer; 2) la porción superior del parasfenoides está en contacto con el mesetmoides y sobrepasa la parte media de este último hueso; 3) la fosa autopterótica es reducida; 4) el margen ventral del lacrimal

es recto; y 5) el margen dorsal del interopérculo, con una extensión larga, excede el borde del hueso.

El género *Profundulus* fue erigido y diagnosticado por Hubbs (1924); Miller (1955) en su análisis taxonómico sobre *Profundulus* (Cyprinodontidae), adiciona caracteres diagnósticos para caracterizar a este género (forma del premaxilar y la naturaleza de la placa hipural, esta última está dividida en partes subiguales por una ranura, y el número de branquiespinas). Parenti (1981) distinguió a *Profundulus* (único integrante de la familia Profundulidae) de todos los otros ciprinodontoides por una *fosa autopterótica grande* y un alto número de branquiespinas en la rama superior del primer arco branquial (14-23). Con la reclasificación de *Profundulus* en dos géneros, *Profundulus* y *Tlaloc* (Morcillo *et al.*, 2016), el carácter diagnóstico de la *fosa autopterótica grande* es ahora limitado a *Profundulus*.

Profundulus es diagnosticado en este trabajo con base en seis caracteres morfológicos exclusivos: 1) el mesetmoides pequeño, en forma de media luna, y no excede los márgenes del vómer; 2) la porción superior del parasfenoides, está justo en contacto con el mesetmoides y no va más allá de la parte medial de este último hueso; 3) la fosa autopterótica grande; 4) el margen ventral del lacrimal es ligeramente cóncavo; 5) el vomer amplio, carece de procesos laterales y está en contacto con los etmoides laterales 6) el margen dorsal del interopérculo, con una corta extensión, que no excede el borde del hueso.

Miller (1955) separó a los dos subgéneros (*Tlaloc* y *Profundulus*) basados en la presencia en *Profundulus* o ausencia en *Tlaloc* de escamas conspicuamente incrustadas en la región del preorbital, la mitad basal o más de la aleta caudal densamente escamada, y por la presencia de una mancha humeral en *Profundulus* y ausente en *Tlaloc*. Estos caracteres de la morfología externa estuvieron basados en el análisis de solamente cinco especies descritas. Aunque con la mayoría de las especies estos caracteres permiten la separación de géneros; en este estudio, incluyendo las 13 especies descritas actualmente, ninguno de estos caracteres surgio como informativo para diagnosticar ambos géneros.

En cuanto al uso de caracteres morfológicos externos (merísticos y morfométricos) para discriminar entre los géneros, se realizaron análisis exploratorios de Componentes Principales (PCA) utilizando 17 medidas morfométricas; los resultados no fueron útiles para separar los géneros (porcentaje de la varianza explicada por el CP1=23.16%, CP2=14.65%); sin embargo varios de los caracteres merísticos (ej. número de vértebras, numero de escamas en serie lateral, número de escamas predorsales) y morfométricos (ej. Origen de la aleta anal a la base de la caudal; longitud de la mandíbula superior), fueron de utilidad para la elaboración de la clave dicotómica para la identificación de las especies de la familia Profundulidae.

10. 2. Nueva especie en la familia *Profundulidae*

Las revisiones taxonómicas recientes sobre la familia *Profundulidae* indican que contiene entre 8 y 13 especies (Morcillo *et al.*, 2016; Calixto-Rojas *et al.*, 2021, 2023); lo cual refleja su compleja historia taxonómica y la dificultad en el reconocimiento de la composición de especies.

Como producto de numerosas recolectas realizadas en el sureste de México, y particularmente en las partes altas de la cuenca del río Papaloapan, en el estado de Oaxaca, México, se obtuvieron ejemplares que se describen como una especie nueva dentro del género *Profundulus*. La nueva especie, descrita como *P. adani*; está respaldada por evidencia morfológica y molecular (gen mitocondrial COI). Los datos moleculares sugirieron que *P. adani* es la especie hermana de todos los demás miembros del género, excepto *P. mixtlanensis*. Estos resultados contrastan con los obtenidos en la filogenia molecular del presente estudio (Capítulo III), en el cual se utilizó el gen mitocondrial (ND2), en el que *P. adani* resulta como una especie no monofilética; sin embargo, las distancias genéticas para ambos genes fueron de 4.4% y 7.4% (*p*-distancias) respectivamente. Recientemente Calixto-Rojas *et al.* (2023) postulan que *P. adani* es un sinónimo menor de *P. mixtlanensis*. Por lo tanto, la relación entre estas dos especies no está resuelta y se sugiere realizar análisis moleculares y morfológicos complementarios para resolver su situación.

10. 3. Filogenia molecular de la familia *Profundulidae*

En este estudio se generó nueva información molecular basada en un gen mitocondrial; los resultados muestran una alta divergencia entre los géneros *Tlaloc* y *Profundulus* (21.1 % mtDNA; *p* distancias), con base en numerosas muestras provenientes del área de distribución de la familia *Profundulidae*. Estos resultados coinciden con los reportados por Morcillo *et al.* (2016), quienes detectaron valores de 24.5% y 7.8% (*p* distancias) utilizando genes mitocondriales y nucleares respectivamente, para ambos géneros de la familia *Profundulidae*. Estos valores son más altos que los reportados entre otros géneros del orden Cyprinodontiformes; por ejemplo, en la familia Goodeidae, la divergencia reportada entre los géneros *Allophorus* y *Chapalichthys* fue de 6.4% (*p* distancias) para mtCox1 (Webb *et al.*, 2004) y entre *Girardinichthys* y *Skiffia* fue de 10.5% para mtCytb (Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004).

Morcillo *et al.* (2016), basados en datos moleculares (mtDNA y nDNA), propusieron una hipótesis taxonómica con dos modelos: un modelo conservador de ocho especies y un modelo de 12 especies. Ambos modelos proporcionaron evidencias adicionales de una mayor diversidad taxonómica que la originalmente reconocida en esta familia. Los resultados del presente estudio,

utilizando un solo gen mitocondrial (mtDNA); en el que se incluyeron las 13 especies reconocidas, además de nuevas localidades en la zona de distribución de la familia, permitió reconocer la existencia de 15 clados soportados, 12 dentro del género *Profundulus* y tres en el género *Tlaloc*, lo que permite inferir que en la familia Profundulidae existe una mayor diversidad de especies que la actualmente descrita o reconocida.

Dentro del género *Tlaloc*, ambos arboles fueron consistentes; tres de las cuatro especies fueron monofiléticas *T. hildebrandi*, *T. labialis* y *T. portillorum*, con valores de distancias genéticas entre 8 y 10 % (mtDNA *p*-distancias). Sin embargo, *T. candalarius* fue considerado un taxón no monofilético, mostrando una divergencia menor al 1% (mtDNA *p*-distancias) de su taxón hermano *T. labialis*. Basado en los datos (probabilidades de especiación bayesiana sobre 95%) se sugiere que *T. candalarius* podría ser efectivamente el producto de una especiación muy reciente y más estudios de este complejo *T. labialis*-*T. candalarius* podrían ayudar a dilucidar el grado de divergencia genética y morfológica entre ellos.

Teniendo en cuenta la evidencia genética analizada, se reconocen como grupos naturales o monofiléticos dentro del género *Profundulus* a las especies previamente descritas como *P. parentiae*, *P. balsanus*, *P. oaxacae*, *P. chimalapensis*, *P. guatemalensis*, *P. kreiseri* y *P. punctatus*; mientras que *P. adani* y *P. mixtlanensis* no forman grupos monofiléticos; aunque las distancias genéticas entre estos dos linajes fueron de 4.46% (mtDNA, *p*-distancias); este valor se encuentra dentro del intervalo para la mayoría de las especies reconocidas dentro de la familia Profundulidae (3.78-6.33 % *p*-distancias). Estudios recientes (Calixto-Rojas *et al.*, 2023), con base en secuencias genéticas (mtDNA y nDNA), morfológicas, ambientales y geográficas coinciden en señalar a *P. adani* como un taxón no natural. Por lo que se recomienda aumentar espacialmente el muestreo, que no solo se incluya localidades tipo (particularmente de *P. adani*), sino también localidades contiguas dentro de su distribución, que permitan determinar la validez de *P. adani*, utilizando además estudios morfológicos-osteológicos.

Tres clados fueron diferentes a las especies ya conocidas en el género *Profundulus*, lo que podría representar la existencia de especies nuevas, aquí referidas como *Profundulus* sp. “Quetzala”; *Profundulus* aff. *balsanus* y *Profundulus* sp. “Gri-Teh”. Uno de estos linajes *Profundulus* sp. “Quetzala”; coincide con una de las dos especies nuevas descritas recientemente por Calixto-Rojas *et al.* (2023), se trata de *P. emilioi*. El linaje *Profundulus* aff. *balsanus*, referido en Morcillo *et al.* (2016), como *Profundulus* aff. *punctatus*, es material proveniente del río Huachimil, tributario del río Papagayo, Guerrero; del cual solo se cuenta con una sola secuencia; por lo que se sugiere coleccionar y secuenciar más especímenes provenientes del río Huachimil, a fin de aclarar el estatus taxonómico de *Profundulus* aff. *balsanus*. Por otro lado, el linaje descrito

como *Profundulus* sp. “Gri-Teh”, actualmente está en proceso de descripción, con base en especímenes provenientes de la Cuenca del río Grijalva, en Chiapas y ríos del sur del Istmo de Tehuntepec, en Oaxaca y Chiapas.

El uso de una sola fuente de evidencia puede indicar la separación de diferentes linajes; pero la generación de una hipótesis robusta que corrobore su separación (lo que implica que son especies diferentes), requiere múltiples líneas de evidencia (De Queiroz, 2007). La morfología comparativa ha jugado un papel importante en la reconstrucción de la historia evolutiva y clasificación de los peces Cyprinodontiformes, a menudo proporcionando información filogenética útil en diferentes niveles taxonómicos. Por esta razón, sería importante incorporar esta información para evaluar hipótesis alternativas entre miembros de la familia Profundulidae y otros grupos dentro de la Cyprinodontoidei (Dominguez-Cisneros *et al.*, 2023). Por lo que se espera que los resultados de este estudio ayude en la construcción de una clasificación más estable para los miembros de la familia Profundulidae y en la clarificación del estado taxonómico de las especies incluidas en ambos géneros: *Profundulus* (ej. *P. adani* vs. *P. mixtlanensis*; *P. mixtlanensis* vs. *P. rei*) y *Tlaloc* (ej. *T. labialis* vs. *T. candalarius*); así mismo se sugiere el uso de las diversas herramientas y metodologías disponibles actualmente para evaluar hipótesis de especies taxonómicas, ya que esto puede ayudar a reducir la incertidumbre en grupos con historias complejas como es la familia Profundulidae (Calixto-Rojas *et al.*, 2023).

XI. CONCLUSIONES GENERALES

La información obtenida en el presente trabajo con las herramientas morfológicas y moleculares aplicadas al estudio de la familia Profundulidae, ha arrojado información relevante para el conocimiento de la taxonomía y sistemática de la familia. A partir de los resultados obtenidos se sientan las bases para proponer una clasificación más comprensiva de este grupo, además se infieren las relaciones de parentesco entre los géneros y las especies actualmente reconocidas y, finalmente, se propone una hipótesis filogenética de mayor número de especies (15 especies), para la familia Profundulidae. Las conclusiones más relevantes que se obtienen de este estudio son las siguientes:

Las diferencias morfológicas entre los géneros *Tlaloc* y *Profundulus*, en cuanto al uso de caracteres morfológicos-osteológicos, fueron muy evidentes; particularmente los caracteres osteológicos del cráneo fueron muy útiles para diagnosticar y redescubrir a ambos géneros.

El uso de los caracteres morfométricos y merísticos tradicionales fueron de utilidad en la construcción de la clave dicotómica para la identificación de las especies de la familia Profundulidae.

Los resultados basados en los análisis genéticos (mtDNA), mostraron alta divergencia genética entre los géneros *Tlaloc* y *Profundulus* (21.1 % mtDNA; *p*-distancias), lo cual es congruente con los recientes análisis de la familia Profundulidae, donde se corrobora la monofilia de ambos géneros.

El estudio taxonómico y geográfico derivado del presente trabajo permitió detectar casos de nuevos linajes altamente divergentes; así como casos de posibles sinonimias.

Teniendo en cuenta la evidencia genética analizada eficientemente con el gen ND2, se reconoce la existencia de 15 linajes distintivos dentro de la familia Profundulidae; se reconocen como grupos naturales o monofiléticos dentro del género *Profundulus* a las especies previamente descritas como *P. parentiae*, *P. balsanus*, *P. oaxacae*, *P. chimalapensis*, *P. guatemalensis*, *P. kreiseri* y *P. punctatus*; mientras que *P. adani*, *P. rei* y *P. mixtlanensis* no forman grupos monofiléticos; por otro lado, el linaje reconocido como *P. sp.* “Quetzala”, es considerado como *P. emilioi*.

Dos linajes fueron distintivos y diferentes a las especies ya conocidas en el género *Profundulus*, lo que pudiesen representar posibles especies nuevas.

En el género *Tlaloc* se reconocieron tres linajes distintivos que coinciden con tres (*T. portillorum*, *T. hildebrandi*, *T. labialis*) de las cuatro especies actualmente descritas; *T. candalarius* no forma un clado monofilético y su distancia genética (*p*-distancia) es relativamente baja (<1%), con relación a *T. labialis*, su especie hermana.

El gen mitocondrial ND2, utilizado para la reconstrucción de la filogenia de la familia Profundulidae, permitió la discriminación y delimitación de linajes dentro de esta familia; los valores mínimos de distancia genética entre las especies y linajes reconocidos fueron mayores al 3% (*p*-distancias). Las distancias genéticas con este gen se pueden utilizar como un criterio de delimitación de especies dentro de la familia Profundulidae.

XII. LITERATURA GENERAL

- Alvarez, J., Carranza, J., 1951. Descripción de un género y especie nuevos de peces Ciprinodontidos procedentes de Chiapas (Mexico). *Ciencia* 11 (1–2), 40–42.
- Ahl, E. 1935. Über eine Fischsammlung aus Mexiko. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin*, 1935, 107–12.
- Arratia G. 2008. Actinopterygian postcranial skeleton with special reference to the diversity of fin ray elements, and the problem of identifying homologies. In: Arratia G, Schultze H-P, Wilson MVH, editors. *Mesozoic Fishes 4—Homology and Phylogeny*. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil; 2008. pp. 49–101.
- Calixto-Rojas, M., Lira-Noriega, A., Rubio-Godoy, M., Pérez-Ponce de León, G., y C. Pinacho-Pinacho. 2021. Phylogenetic relationships and ecological niche conservatism in killifish (Profundulidae) in Mesoamerica. *J Fish Biol.* 2021; 1– 15.
- Calixto-Rojas, M., Lira-Noriega, A., Rubio-Godoy, M., Pérez-Ponce de León, G., Pinacho-Pinacho, C.D. 2023. Delimitation and species discovery in the Profundulidae fish family: Using genetic, environmental and morphologic data to address taxonomic uncertainty, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107856>
- Costa, W. 2006. Descriptive morphology and phylogenetic relationships among species of the Neotropical annual killifish genera *Nematolebias* and *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 4(1):1-26.
- Costa, W. 2012. The caudal skeleton of extant and fossil Cyprinodontiform fishes (Teleostei: Atherinomorpha): comparative morphology and delimitation of phylogenetic characters. *Vertebrate Zoology*. 62 (2):161-180.
- Costa, W. J. E. M. 1998. Phylogeny and classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha) a reappraisal. p. 537±560, *In: Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, and C. A. S. Lucena (eds.). EDIPUCRS (Editora Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, Brazil.
- Crisci, J. V. y M. F. López-Armengol. 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la taxonomía numérica. Organización de Estados Americanos. Washington, D. C. 132 p.
- Del Moral-Flores, L. F., E. López-segovia, and T. Hernández-arellano. 2020. *Profundulus chimalapensis*, una nueva especie de pez ciprinodóntido (Cyprinodontiformes:

- Profundulidae) del Río Coatzacoalcos, México. *Revista de Biología Tropical* 68:1185–1197.
- De Queiroz, K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>.
- Dingerkus G., and L. D. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *J. Stain Technol.* 52: 229±232.
- Doadrio, I., J. Carmona, E. Martínez, and A. De Sostoa. 1999. Genetic variation and taxonomic analysis of the subgenus *Profundulus*. *Journal of Fish Biology* 55:751–766.
- Doadrio, I., Dominguez, O., 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31 (2), 416–430.
- Domínguez-Cisneros, S.E., Velázquez-Velázquez, E. y M. Anzueto-Calvo. 2017. Ampliación de la distribución geográfica del popoyote de San Cristóbal *Tlaloc hildebrandi* (Miller 1950), (Cyprinodontiformes: Profundulidae). *LACANDONIA*, 11(2): 13-18.
- Fricke, R., W. N. Eschmeyer, and R. van der Laan. 2020. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. Available at <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. (accessed 20 November 2020).
- Fujita, K. 1989. Nomenclature of cartilaginous elements in the caudal skeleton of teleostean fishes. *Japanese Journal of Ichthyology* 36(1): 22-29
- Gonzalez-Diaz, A.A., Diaz-Pardo, E., Soria-Barreto, M., Martinez-Ramirez, E., 2014. Diferencias Osteológicas entre los Subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc* (Teleostei: Profundulidae). *Int. J. Morphol.* 32 (3), 1074–1078, Retrieved from <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022014000300053>.
- González-Díaz, A. A.; Díaz-Pardo, E.; Soria-Barreto, M. & Rodiles-Hernández, R. 2005. Análisis morfométrico de los peces del grupo labialis, género *Profundulus* (Cyprinodontiformes: Profundulidae) en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodivers.*, 76(1-2):55-61.
- Gosline, W. 1961. Some osteological features of modern lower Teleostean Fishes. *Smithsonian Miscellaneous Collections*. Volume 142, Number 3: 1-42.
- Guedoti, M.J. and M.P. Davis. 2013. Phylogeny, Classification, and Evolution of Salinity Tolerance of the North American Topminnows and Killifishes, Family Fundulidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). *FIELDIANA: Life and Earth Sciences*, No. 7: 1–65.
- Günther, A. 1866. An account of the fishes of the states of Central America: based on collections made by Capt. J. M. Dow, F. Godman and O. Salvin. U. S. National Museum. 184 P.

- Hertwig, S. T. 2008. Phylogeny of the Cyprinodontiformes (Teleostei, Atherinomorpha): the contribution of cranial soft tissue characters. *Zoologica Scripta*, 37 (2).
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2007.00314.x>
- Hoedeman, J.J. y Bronner, F.J. (1951). De orde van de tandkarpertjes. VI. Cyprinodontiformes Berg. 1940. *Het Aquarium*, 1, 1-3.
- Hubbs, Carl L. 1924. Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology University of Michigan* (13): 1-31.
- Jamangapé, J. A., E. Velázquez-Velázquez, E. Martínez-Ramírez, M. de J. Anzueto-Calvo, E. L. Gómez, S. E. Domínguez-Cisneros, C. D. McMahan, and W. A. Matamoros. 2016. Validity and Redescription of *Profundulus balsanus* Ahl, 1935 (Cyprinodontiformes: Profundulidae). *Zootaxa* 4173:55–65.
- Lyons, T.J. & Barraza, E. 2020. *Profundulus guatemalensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T164692249A164692521.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20202.RLTS.T164692249A164692521.en>
- Lyons, T.J. & Matamoros, W.A. 2020. *Tlaloc portillorum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T125347429A164692340.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20202.RLTS.T125347429A164692340.en>
- Matamoros, W.A. & Schaefer, J.F. 2010. A new species of *Profundulus* (Cyprinodontiformes: Profundulidae) from the Honduran central highlands. *Journal of Fish Biology*, 76, 1498–1507. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02596.x>
- Matamoros, W. A., J. F. Schaefer, C. L. Hernández, and P. Chakrabarty. 2012. *Profundulus kreiseri*, a new species of Profundulidae (Teleostei, Cyprinodontiformes) from northwestern Honduras. *ZooKeys* 227:49–62
- Matamoros, W. A., S. E. Domínguez-Cisneros, E. Velázquez-Velázquez, and C. D. McMahan. 2018. Description of a New Species of Killifish of the Genus *Profundulus* (Atherinomorpha: Profundulidae) from the Mexican State of Oaxaca. *Copeia* 106:239–246.
- McCranie, J.R., Castañeda, F.E., Estrada, N., Ferrufino, L., Germer, D., Matamoros, W. and SagastumeEspinoza, K.O. 2018. Biodiversity in Honduras: The Environment, Flora, Bats, Medium- and Large-Sized Mammals, Birds, Freshwater Fishes, and the Amphibians and Reptiles. In: Pullaiah, T. (ed.), *Global Biodiversity: Volume 4: Selected Countries in the Americas and Australia*, CRC Press.
- Meek, S. E. 1902. A Contribution to the Ichthyology of Mexico. *Field Columbian Mus., Publ.* 65 (Zool. Ser.) 3 (6): 63-128, Pls. 14-31.

- Miller, R. 1948. The Cyprinodont Fishes of the Death Valley System of Eastern California and Southwestern Nevada. MISCELLANEOUS PUBLICATIONS MUSEUM OF ZOOLOGY, UNIVERSITY OF MICHIGAN, NO. 68:1-200.
- Miller, R., 1955. A Systematic Review of the Middle American fishes of the genus *Profundulus*. Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan, 92
- Miller, R., 2005. Freshwater Fishes of Mexico, vol. 1. The University of Chicago Press, Chicago.
- Miller, R.R. 1955. A systematic review of the Middle American Fishes of the genus *Profundulus*. Miscellaneous Papers Mus. Zool. Univ. Mich. 92.
- Morcillo, F., C. P. Ornelas-García, L. Alcaraz, W. A. Matamoros, and I. Doadrio. 2016. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the Mesoamerican endemic freshwater fish family Profundulidae (Cyprinodontiformes : Actinopterygii). *Molecular phylogenetics and evolution* 94:242–251.
- Nelson, J. 1994. Fishes of the world. 3rd edition, XVII, 600p. John Wiley and Sons.
- Nelson, J.S., Grande, T.C. and Wilson, M.V.H. (2016) Fishes of the World. 5th Edition, John Wiley and Sons, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781119174844>
- Ornelas-García, C. P., E. Martínez-Ramírez, and I. Doadrio. 2015. A new species of killifish of the family Profundulidae from the highlands of the Mixteca region, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:926–933.
- Parenti, L. R. 1981: A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 168, pt. 4. 335-557.
- Parenti, L. R. 2002. "The killifishes: an annotated checklist, synonymy and bibliography of recent oviparous cyprinodontiform fishes: the killifish master index," *Copeia* 2002(3), 881-883, (1 August 2002). [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[0882:2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0882:2.0.CO;2)
- Piller KR, Parker E, Lemmon AR, Lemmond EM. 2022. Investigating the utility of Anchored Hybrid Enrichment data to investigate the relationships among the Killifishes (Actinopterygii: Cyprinodontiformes), a globally distributed group of fishes. *Mol Phylogenet Evol.* 2022; 173:107482. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107482>
- Schultze, H. P. and G. Arratia. 2013. The caudal skeleton of basal teleosts, its conventions, and some of its major evolutionary novelties in a temporal dimension. *En: Mesozoic Fishes 5 – Global Diversity and Evolution*, G. Arratia, H.-P. Schultze & M. V. H. Wilson (eds.): pp. 187-246, 24 figs., 4 tabs. © 2013 by Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany – ISBN 978-3-89937-159-8

- Taylor y Van Dike, 1985. Taylor, W.R. & G. C. Van Dyke. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, 9: 107–109.
- Taylor, W.R. 1967. An Enzyme Method of Clearing and Staining Small Vertebrates. *Proceedings of the United States National Museum*. 122 (3596): 1-17.
- Tyler, 1980. Tyler J. 1980. Osteology, phylogeny and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodontiformes). NOAA Technical Report NMFS Circular 434: 1-422.
- Uyeno, T. and R. R. Miller. 1962. Relationships of *Empetrichthys erdisi*, a Pliocene Cyprinodontid Fish from California, with remarks on the Fundulinae and Cyprinodontinae. *Copeia*, 3:520-532.
- Van Der Laan, R., Eschmeyer, W. & R. Fricke. 2014. Family-group names of recent fishes. *Zootaxa* 3882 (2): 001–230.
- Velázquez- Velázquez, E.; E. Domínguez-Ruiz, S. Domínguez-Cisneros, J. Hernández y R. Rodríguez. 2007. Monografía de *Profundulus hildebrandi* Miller, 1950, Pez endémico de Chiapas, UNICACH.
- Velázquez-Velázquez, E., J. J. Schmitter-Soto and S. Domínguez-Cisneros. 2008. Threatened fishes of the world: *Profundulus hildebrandi* Miller, 1950 (Profundulidae). *Environmental Biology of Fishes* 84(4): 345–346. doi: 10.1007/s10641-008-9425-8
- Velázquez-Velázquez, E. y J. J. Schmitter-Soto. 2004. “Conservation status of the San Cristóbal pupfish *Profundulus hildebrandi* Miller (Teleostei: Profundulidae) in the face of urban growth in Chiapas, México”, en *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14: 201-209.
- Webb, S.A., Graves, J.A., Macias-Garcia, C., Magurran, A.E., Foighil, D.O., Ritchie, M.G., 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 30 (3), 527–544.
- Wilson J. E. M. Costa. 2006. Descriptive morphology and phylogenetic relationships among species of the Neotropical annual killifish genera *Nematolebias* and *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 4(1):1-26, 2006.
- Wilson J. E. M. Costa. 2006. Phylogeny and Classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha): A Reappraisal. Pp 537-560. In: Luiz R Malabarba (Ed) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS.