



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Delimitación de especies en *Poecilia butleri* y
Poecilia nelsoni (Cyprinodontiformes:
Poeciliidae), dos especies crípticas de la
vertiente del Pacífico mexicano

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

DINY GUADALUPE GONZÁLEZ VELÁZQUEZ

Director

DR. WILFREDO ANTONIO MATAMOROS ORTEGA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

junio de 2024





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas:
 Fecha: 14 de junio de 2024

C. Diny Guadalupe González Velázquez

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Delimitación de especies en *Poecilia butleri* y *Poecilia nelsoni* (Cyprinodontiformes:

poeciliidae) dos especies crípticas de la vertiente del pacífico mexicano

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dr. Miguel Angel Peralta Meixueiro

M. en C. Erika Cecilia Pérez Ovando

Dr. Wilfredo Antonio Matamoros Ortega

Firmas:

[Firma]
[Firma]
Wilfredo Matamoros

Ccp. Expediente



Agradecimientos

Durante el transcurso de 2 años exactos que duró la realización completa de este estudio, que inició un 13 junio del 2022 y se terminó de escribir el 13 de junio de 2024, he recibido ayuda financiera, estímulo y asistencia de muchas personas e instituciones.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi alma mater la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) y al Instituto de Ciencias Biológicas por proporcionarme el entorno académico necesario para llevar a cabo mis estudios de licenciatura, además de su gestión y apoyo para participar en diversos programas de investigación, divulgación y movilidad lo cual ha sido fundamental para mi formación académica, profesional y el desarrollo de este proyecto.

Quiero también agradecer a El Colegio de la Frontera Sur unidad San Cristóbal de las Casas (ECOSUR) y al Dr. Alfonso Ángel González Díaz por proporcionarme sus instalaciones, la colección ictiológica y las muestras necesarias para la toma de datos. Agradezco profundamente los conocimientos y la guía del Dr. González Díaz, que han sido esenciales para el desarrollo y éxito de esta investigación.

Agradezco especialmente a mi director de tesis, el Dr. Wilfredo Antonio Matamoros Ortega, cuyo conocimiento, paciencia, motivación y orientación han sido invaluable desde la concepción del proyecto hasta la redacción final de este documento. Su dedicación y apoyo como director es inusual y excepcional, gracias por tanto tiempo dedicado y por hacerme sentir como parte de una familia dentro del laboratorio de diversidad acuática y biogeografía.

También agradezco a los miembros del jurado, la Mtra. Erika Cecilia Pérez Ovando, el Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro y el Dr. Wilfredo Antonio Matamoros Ortega, por sus comentarios constructivos y su disposición a evaluar este trabajo, que han sido esenciales para mejorar la calidad de esta tesis.

Agradezco profundamente a todos los compañeros y amigos del laboratorio de diversidad acuática y biogeografía, quienes han contribuido con su conocimiento, amistad y apoyo además de una fuente constante de motivación para terminar la tesis. Gracias por las largas horas en el laboratorio oliendo a naftalina.

También tengo una deuda de gratitud con mi amiga y colega Daniela fletes Ocampo quien me recibió en su hogar, me acompañó días en ECOSUR, me llevo a lugares y experiencias hermosas en San Cristóbal de las Casas, con sus padres la Dra. María Guadalupe Ocampo Guzmán y el Dr. Héctor Bernabé Fletes Ocón quienes me abrieron las puertas de su hogar por un mes entero aunque se suponía solo sería un par de días y me trataron como una más de su familia, a sus tías la Ing. Isidra Ocampo Guzmán y la Lic. Graciela Ocampo Guzmán que ofrecieron transporte durante mi estancia en ECOSUR, siempre impulsándome a ser mejor. Estaré eternamente agradecida con todos ustedes por su apoyo y cariño.

Agradezco a mi amiga desde hace 10 años, Fátima Yeraldi Brindis Gordillo quien me prestó su casa en San Cristóbal de las Casas cada fin de semana durante un semestre completo, mientras yo recolectaba los datos para esta tesis.

Estoy agradecida con mis mejores amigos y colegas desde que inicié la carrera, Litzy del Carmen Gómez Hernández, Carlos Edmundo Zúñiga Dávila y a mi roomie Cinthia Karime Roblero Oroxón con quienes viví momentos inolvidables, gracias por apoyo personal y emocional durante toda la carrera, su aliento y comprensión me han ayudado a superar los momentos difíciles y a seguir adelante.

Además, deseo expresar desde lo más profundo de mi corazón, mi gratitud al Biólogo Manuel Ángel Galeana Rivera, por ser un colega y mentor excepcional, que estuvo involucrado de inicio a fin en este estudio, fue quien me enseñó a realizar innumerables análisis y siempre estuvo pendiente a la corrección del manuscrito, enriqueciendo este trabajo de manera excepcional. Gracias amor, por siempre estar a mi lado, en mis momentos más difíciles, sin dejarme sola nunca, brindándome tu apoyo incondicional, tu amor y aliento constante me han impulsado a mejorar académicamente y a superar cada obstáculo en el camino. Tu invaluable ayuda, estímulo, colaboración y asesoramiento fue crucial para la elaboración de esta tesis.

No puedo olvidar mencionar mi agradecimiento por hacía mis familiares, desde Villaflores hasta Tuxtla Gutiérrez, que siempre han estado orgullosos de mí y me han apoyado en todo momento. En especial a mi tía y segunda madre, Teresa de Jesús Velázquez Gómez quien me crió desde pequeña, siendo mi apoyo y mi fan número uno siempre, a mis tíos y padrinos, Dina del Rosario Macias Nandayapa y Robertoni Ramos Hernández, siempre presentes, nunca ha dudado en apoyarme de múltiples formas y siempre han cuidado de mí, a mis padrinos de licenciatura, María de los Ángeles Meneses González y Jorge Alejandro Ruiz Cruz, que siempre me aconsejaron e impulsaron en mis decisiones académicas y personales, siendo siempre un apoyo cálido y familiar.

A mis hermanos José Alexei González Velázquez y Paola del Roció González Velázquez, por su amor, paciencia y por creer siempre en mí, su apoyo ha hecho mi vida mucho más amena y plena, y por esta tesis le agradezco en especial mi hermana Paola quien aportó realizando las preciosas ilustraciones sobre *Poecilia butleri* y *P nelsoni*.

A MI PADRE

Gracias a usted, he llegado a realizar uno de mis más grandes anhelos en la vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mí ha depositado y con los cuales finalizo esta etapa de mis estudios que constituyen el legado más grande que pudiera recibir. Agradezco eternamente todo lo que ha dado, lo que ha sacrificado y su esfuerzo por darme lo mejor de usted.

A MI MADRE

Gracias a usted, desde pequeña he abrazado con pasión el cuidado del medio ambiente y la apreciación por la vida en todas sus formas. Su amor, dedicación y valentía me han guiado en cada paso de mi educación y en la vida. Ha estado presente en cada momento importante de mi vida, ha trabajado más que nadie y estoy profundamente agradecida por todo lo que ha hecho y sacrificado por mí. Gracias a ambos por permitirme elegir mi destino.

Finalmente, doy gracias a Dios y al universo por guiarme, brindarme fuerza y sabiduría en cada paso de mi camino siendo una fuente de paz y esperanza en mi vida.

Con cariño,

Diny Guadalupe González Velázquez.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. ORDEN CYPRINODONTIFORMES	4
2.1.1. Familia Poeciliidae.....	5
2.1.2. Género <i>Poecilia</i> (Bloch y Schneider, 1801)	6
2.1.3 Diversidad de especies en el género <i>Poecilia</i>	7
2.2. DESCRIPCIÓN ORIGINAL DE <i>POECILIA BUTLERI</i> (JORDAN, 1889)	8
2.3. DESCRIPCIÓN ORIGINAL DE <i>POECILIA NELSONI</i> = <i>PLATYPOECILUS NELSONI</i> (MEEK 1904).....	8
2.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>P. BUTLERI</i> Y <i>P. NELSONI</i>	10
2.5. ESPECIES CRÍPTICAS.....	10
2.5.1. Relevancia del origen del cripticismo y su afección en la conservación y manejo de especies.....	10
2.6. ESPECIES HERMANAS	11
2.7. MÉTODOS TRADICIONALES DE DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE PECES.....	11
2.7.1. Datos merísticos	12
2.7.2. Datos morfométricos.....	15
2.7.3. Comportamiento reproductivo.....	17
2.7.4. Limitaciones del método tradicional de delimitación de especies	18
2.8. MÉTODOS ACTUALES DE DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE PECES	18
2.8.1. Análisis Integrado de Distribución Geográfica y Filogeografía.....	18
2.8.2. Técnicas moleculares de identificación	19
2.8.3. Filogenética molecular	19
2.8.4. Red de haplotipos.....	20
2.8.5. Árbol filogenético de inferencia bayesiana	20
2.8.6. Morfometría geométrica en peces	21
2.8.7. Análisis de componentes principales (PCA)	22

2.8.8. Análisis de variables canónicas (CVA)	22
III. ANTECEDENTES.....	23
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	26
V. ZONA DE ESTUDIO.....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	30
6.1.1. Morfometría lineal	30
6.1.2. Morfometría geométrica.....	35
6.2. ANÁLISIS MOLECULARES.....	37
VII. RESULTADOS	39
7.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	39
7.1.1. Morfometría lineal	39
7.1.1. Análisis de Componentes Principales (PCA).....	44
7.1.2. Morfometría geométrica.....	48
7.2. ANÁLISIS MOLECULARES.....	50
7.2.1. Red de haplotipos.....	50
7.2.2. Inferencia filogenética.....	52
VIII. DISCUSIÓN	53
IX. CONCLUSIONES.....	57
X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	58
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES	59
XII. ANEXOS	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración incluida en la descripción original de <i>Platypoecilus nelsoni</i> (Meek, 1904)	9
Figura 2. Ilustración original de Miller (1945) de 2 especies de <i>Cyprinodon</i> , para ilustrar los métodos de recuento de escamas en las series lateral, dorsal a pélvica y dorsal a anal. Dibujado por Grace Eager. A. <i>Cyprinodon nevadensis nevadensis</i> : 26 escamas laterales. B. <i>Cyprinodon salinus</i> : 33 escamas laterales.....	14
Figura 3. Ilustración sobre la toma de datos morfométricos en peces, basada en Miller (1948). (ilustración por: Wilfredo A. Matamoros)	17
Figura 4. Mapa de distribución de los puntos de colecta de los lotes, así como de las secuencias del Cytb de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i>	27
Figura 5. Ilustración sobre la toma de datos de anchura del cuerpo en <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> . Las abreviaciones se explican en el cuadro 1 (ilustración por: Paola González).....	30
Figura 6. Ilustración sobre la toma de datos morfométricos para A) hembras B) machos en <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> (ilustración por: Paola González)	32
Figura 7. Ilustración sobre la toma de datos merísticos para A) hembras B) machos en <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> . Las abreviaciones se explican en el Cuadro 2 (ilustración por: Paola González).....	34
Figura 8. Localización de los 17 puntos de referencia anatómicos en machos.....	36
Figura 9. Localización de los 17 puntos de referencia anatómicos en hembras	36
Figura 10. Mapa de distribución de los puntos de colecta de los lotes de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i>	39
Figura 11. Análisis de componentes principales entre machos de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> a partir de los datos morfométricos estandarizados obtenidos	44
Figura 12. Análisis de componentes principales entre hembras de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> a partir de los datos morfométricos estandarizados obtenidos	45
Figura 13. Análisis de componentes principales entre machos de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> a partir de los datos merísticos obtenidos.....	46

Figura 14. Análisis de componentes principales entre hembras de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> a partir de los datos merísticos	47
Figura 15. Análisis de Variables Canónicas entre machos de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> a partir de los datos de morfometría geométrica.....	48
Figura 16. Análisis de Variables Canónicas entre hembras de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> a partir de los datos de morfometría geométrica	49
Figura 17. Mapa de distribución de los puntos de colecta de las secuencias del Cytb de <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i>	50
Figura 18. Red de haplotipos del Cytb, los nodos de secuencia correspondientes a <i>P. butleri</i> están en celeste y las secuencias de <i>P. nelsoni</i> en rosa	51
Figura 19. Análisis filogenético bajo inferencia bayesiana realizado con las secuencias del Cytb de <i>Belonesox belizanus</i> , <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i> obtenidas de GenBank	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Listado de caracteres morfométricos utilizados en el estudio.....	31
Cuadro 2. Listado de caracteres merísticos utilizados en el estudio.....	33
Cuadro 3. Variabilidad de la longitud estándar en <i>P. butleri</i> y <i>P. nelsoni</i>	40
Cuadro 4. Estadísticos descriptivos de los caracteres merísticos en hembras y machos de <i>P. butleri</i>	40
Cuadro 5. Estadísticos descriptivos de los caracteres merísticos en hembras y machos de <i>P. nelsoni</i>	41
Cuadro 6. Estadísticos descriptivos de los caracteres morfométricos en hembras y machos de <i>P. butleri</i>	42
Cuadro 7. Estadísticos descriptivos de los caracteres morfométricos en hembras y machos de <i>P. nelsoni</i>	43

RESUMEN

El género *Poecilia* (Cyprinodontiformes), comúnmente conocido como *mollies*, es un grupo diverso de peces de agua dulce con 42 especies válidas distribuidas en ríos de Norte, Centro y Sur América. Con el tiempo, este género ha sufrido importantes cambios taxonómicos; un buen ejemplo de esto son las especies *P. butleri* y *P. nelsoni*, estas especies fueron descritas en 1889 y 1904, respectivamente. Posteriormente, *P. nelsoni* fue sinonimizada con *Poecilia sphenops* y, años más tarde, con *P. butleri* mediante análisis morfológicos. Recientemente, estudios filogenéticos basados en el ADN mitocondrial y nuclear del complejo de especies *Poecilia mexicana* resucitaron a *P. nelsoni* como una especie válida y hermana de *P. butleri*. Actualmente, no existe una distinción morfológica clara entre *P. butleri* y *P. nelsoni*, tampoco existen caracteres diagnósticos que permitan la identificación de estas especies en sus ambientes naturales. Este estudio tiene como objetivo generar un análisis entre *P. butleri* y *P. nelsoni*, a través de caracteres morfológicos y moleculares, utilizando métodos taxonómicos tradicionales y contemporáneos que exploren la complejidad existente entre ambas especies y permitan su delimitación. Los resultados muestran evidencia sobre una naturaleza críptica entre las dos especies, ya que los Análisis de Componentes Principales (PCA) morfométricos y merísticos muestran una clara superposición en el espacio multivariado entre *P. butleri* y *P. nelsoni*. Los Análisis de Variantes Canónicas (CVA) de morfometría geométrica consigue separar ambas especies, con una clara distinción entre los machos de cada especie y poco solapamiento en las hembras. Ambas especies son molecularmente distintivas; el árbol filogenético reconstruido muestra dos clados bien definidos, uno al norte del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM) y el otro al sur, y la red de haplotipos no mostró ningún intercambio de haplotipos entre las dos especies. No se logró identificar caracteres morfológicos que nos permitan diferenciar una especie de otra, lo que indica la necesidad de confiar en la distribución geográfica, los análisis genéticos y la forma corporal para identificar o segregar ambas especies. El uso de una taxonomía integradora se muestra necesario para comprender mejor la biodiversidad y la unidad básica de clasificación de los organismos, la especie ya que el proceso de especiación no siempre implica cambios morfológicos a la par.

Palabras clave: *Poecilia*, delimitación de especies, taxonomía, biodiversidad y especies crípticas.

ABSTRACT

The genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes), commonly known as mollies, is a diverse group of freshwater fishes with 42 valid species distributed in rivers of Central, South and North America. Over time, this genus has undergone important taxonomic changes; a good example of this are the species *P. butleri* and *P. nelsoni*, these species were described in 1889 and 1904, respectively. Subsequently, *P. nelsoni* was synonymized with *Poecilia sphenops* and, years later, with *P. butleri* by morphological analysis. Recently, phylogenetic studies based on mitochondrial and nuclear DNA of the *Poecilia mexicana* species complex resurrected *P. nelsoni* as a valid sister species to *P. butleri*. Currently, there is no clear morphological distinction between *P. butleri* and *P. nelsoni*, nor are there diagnostic characters that allow the identification of these species in their natural environments. This study aims to generate a more complete and precise analysis between *P. butleri* and *P. nelsoni*, through morphological and molecular characters, using traditional and contemporary taxonomic methods to explore the complexity between both species and allow their delimitation. The results show evidence of a cryptic nature between the two species, as morphometric and meristic Principal Component Analyses (PCA) show a clear overlap in multivariate space between *P. butleri* and *P. nelsoni*. Canonical Variant Analyses (CVA) of geometric morphometrics manage to separate both species, with a clear distinction between males of each species and little overlap in females. Both species are molecularly distinctive; the reconstructed phylogenetic tree shows two well-defined clades, one to the north of the Trans Mexican Volcanic Belt and the other to the south, and the haplotype network showed no haplotype exchange between the two species. No morphological characters were identified that would allow us to differentiate one species from the other, indicating the need to rely on geographic distribution, genetic analyses, and body shape to identify or segregate the two species. The joint use of traditional and contemporary methods is necessary to better understand biodiversity and the basic unit of classification of organisms, the species, since the process of speciation does not always involve morphological changes at the same time.

Key words: *Poecilia*, species delimitation, taxonomy, biodiversity and cryptic species.

I. INTRODUCCIÓN

La existencia de especies indistinguibles morfológicamente, llamadas especies crípticas, ha sido un tema de debate desde que las técnicas de análisis genético se incluyeron en estudios de taxonomía y sistemática. Durante este periodo y debido a la intrincada naturaleza del cripticismo muchos autores han intentado definir el concepto (Sáez, 2021).

La lente teórica que proporcionan Bickford *et al.*, (2007), aborda el concepto de especie críptica excluyendo la característica de aislamiento reproductivo que algunos autores incluyen para no caer en el persistente debate que existe por los diversos conceptos de “especie” existentes. De este modo, una especie críptica se define como las especies que están o han estado clasificadas como una única especie nominal. Se caracterizan por ser indistinguibles morfológicamente (al menos de forma superficial), así mismo, estas deben haber divergido recientemente, son separables sólo a través de datos moleculares y se encuentran en simpatría; estas características, aunque importantes a tomar en cuenta, no son imprescindibles para catalogar a una especie como críptica (Bickford *et al.*, 2007).

Al considerar la característica principal de las especies crípticas; que es estar clasificadas bajo un único nombre científico, podemos hablar del efecto significativo que tiene el cripticismo en la estimación de la diversidad y las implicaciones negativas en el trabajo de conservación y gestión de la diversidad biológica, ya que producen una subestimación de la cantidad real de especies en un clado (Bickford *et al.*, 2007).

Existen diversos ejemplos que enmarcan las consecuencias del desconocimiento de la existencia de especies crípticas: M'hamed *et al.*, 2016 en su estudio sobre la especie *Thaumetopoea pityocampa* como plaga en el Mediterráneo, discuten como la existencia de cripticismo complica el manejo de plagas. Otra investigación sobre el alga *Polysiphonia morrowii*, describe cómo las poblaciones recientemente encontradas en Francia y Argentina están estrechamente relacionadas entre sí, pero difieren significativamente de las poblaciones originarias de Corea y

Japón, lo que sugiere que estas poblaciones podrían haber existido antes de ser reconocidas, así, la diversidad genética encontrada, respalda una historia de colonización más compleja de lo esperado y cambia la perspectiva de su manejo (Geoffroy *et al.*, 2016).

Por ejemplo, un estudio sobre la primula amenazada (*Primula farinosa*), destaca cómo la dependencia de métodos taxonómicos tradicionales para definir límites geográficos y unidades biológicas de especies puede llevar a pasar por alto una significativa diversidad críptica. La identificación de distintos linajes evolutivos ofrece una base para definir unidades de conservación intraespecíficas más precisas, lo cual es crucial para definir las estrategias de conservación de especies amenazadas, resaltando la relevancia del cripticismo para entender y proteger mejor la biodiversidad, ya que la omisión de especies crípticas puede resultar en la extinción de estas (Theodoridis *et al.*, 2019).

Conocer las limitantes que ha representado históricamente basar las descripciones de las especies en caracteres morfológicos-visuales que por sí solos no siempre han sido capaces de discriminar a una especie de la otra y que han interferido en la estimación de la diversidad, han hecho necesario el determinar nuevos caracteres de diagnóstico como los químicos y moleculares, caracteres que en la actualidad son posibles de incluir para los estudios taxonómicos debido a los avances de las últimas décadas, principalmente en estudios sistemáticos basados en secuenciación del ADN (Bickford *et al.*, 2007). Estos caracteres podrían fungir como columna vertebral de una descripción taxonómica (Jörger y Schrödl, 2013).

El género *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) es uno de los géneros más diversos de peces dulceacuícolas distribuidos en ríos de América Central, del Sur y del Norte con 42 especies válidas (Froese y Pauly, 2023), comúnmente conocidos como mollies. Tienen una intrincada historia taxonómica debido a los importantes arreglos nomenclaturales que históricamente se han realizado en el grupo; sin embargo, estudios moleculares recientes han demostrado que aun con los constantes arreglos, se ha subestimado la diversidad del género, sugiriendo la

existencia de diferentes complejos de especies que incluyen algunos taxones que necesitan futura descripción (Palacios *et al.*, 2016).

Análisis filogenéticos moleculares centrados en el género *Poecilia* sugieren que eventos geológicos relacionados a la formación del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM), han sido precursores de una ruptura biogeográfica (Rico *et al.*, 2022) que ha afectado la diversificación de algunos linajes de peces dulceacuícolas, como la especiación vicariante entre los poecilidos, debido a la fragmentación y aislamiento de sus poblaciones (Mateos, 2005); influyendo también en otros taxones de la región (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015), como aves (Rodríguez-Gómez y Ornelas, 2015), reptiles (Cisneros-Bernal *et al.*, 2022), insectos (Lozano-Fuentes *et al.*, 2009) y plantas (Mastretta-Yanes *et al.*, 2018).

Dentro de *Poecilia*, las especies *Poecilia butleri* y *Poecilia nelsoni* han sido objeto de diferentes cambios taxonómicos. *P. butleri* fue descrita en 1889 por Jordan y *P. nelsoni* en 1904 por Meek, aunque fue originalmente descrita bajo el nombre *Platypoecilus nelsoni*. Posteriormente *P. nelsoni* fue sinonimizada con *P. sphenops Valenciennes* (Rosen y Bailey, 1963) y años después con *P. butleri* (Parenti *et al.*, 1999).

Recientemente Mateos (2005) y Palacios *et al.* (2016) determinaron que *Poecilia butleri* y *Poecilia nelsoni* son dos especies válidas y que estas especies se originaron como resultado de un evento vicariante relacionado a la formación del ENTM. Aunque actualmente existen estudios que consideran a *P. butleri* y *P. nelsoni* como especies hermanas que están aisladas, ambas especies tienen diagnósticos poco útiles por su simplicidad basadas en metodología taxonómica tradicional que no presentan características descritas que funjan como caracteres diagnósticos, impidiendo distinguir una especie de la otra.

Dado que no existe ningún estudio que analice la variación morfológica dentro y entre estas dos especies, es importante actualizar sus diagnósticos con métodos apropiados para alcanzar los estándares modernos. El propósito de este estudio es delimitar ambas especies utilizando caracteres morfológicos, moleculares y de distribución geográfica, que permitan distinguir claramente sus poblaciones naturales.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ORDEN CYPRINODONTIFORMES

El Orden Cyprinodontiformes es un grupo de peces que incluye diversas familias y géneros de peces de agua dulce y salobre, que se caracterizan por su tamaño pequeño a mediano, variedad de estrategias reproductivas y dimorfismo sexual (Nelson, 1994).

De acuerdo con Nelson (1994) los caracteres diagnósticos de este orden corresponden a:

Una aleta caudal simétrica que se sostiene internamente mediante un epural; la primera costilla pleural se encuentra en la segunda vértebra en lugar de la tercera. En estado primitivo, la cintura escapular tiene una implantación baja y presenta un postcleitrum en forma de escamas; un brazo alveolar de los premaxilares y un período de desarrollo prolongado.

Además, el autor puntualiza otros rasgos distintivos, como:

La presencia de la línea lateral con canales y poros principalmente en la cabeza, mientras que en el cuerpo sólo se representan mediante escamas puntiagudas. Las aberturas nasales son emparejadas, y los radios branquiostegales varían de 3 a 7; las aletas pélvicas y la cintura pueden estar presentes o ausentes, y la mandíbula superior está limitada únicamente por el premaxilar, siendo protrusible; generalmente se puede encontrar el vómer, mientras que el supracleitrum siempre está presente; el metapterigoideo generalmente está ausente, y el ectopterigoideo siempre falta; los parietales pueden estar presentes o ausentes, y el número de vértebras varía entre 24 y 54.

El Orden Cyprinodontiformes está compuesto por 14 familias: Aplocheilidae, Nothobranchiidae, Rivulidae, Pantanodontidae, Fundulidae, Cyprinodontidae, Profundulidae, Goodeidae, Fluviphylacidae, Anablepidae, Aphaniidae, Valenciidae, Procatopodidae y Poeciliidae, que incluyen a 145 géneros y 1 442 especies válidas (Fricke *et al.*, 2023).

2.1.1. Familia Poeciliidae

Meyer y Scharl (2017) indican que la familia Poeciliidae pertenece al orden Cyprinodontiformes, según Fricke *et al.*, (2023) está compuesta por 27 géneros y 274 especies válidas de peces conocidos por su capacidad de viviparidad, teniendo fecundación interna por medio de un órgano intromitente (gonopodio) en los machos, que es una modificación de los radios 3-5 de la aleta anal. Las especies de poecílicos tienen crías que nadan libremente sin saco vitelino y los huevos eclosionan dentro de la cavidad uterina (viviparidad), la madre alimenta a las larvas en desarrollo mientras están en la cavidad uterina (Morales y Albert, 2012).

La traducción literal de la descripción original de la familia es:

Las aletas pectorales están ubicadas en una posición alta en el costado del cuerpo debido a la colocación dorsal de los radios en el escapulocoracoide; las aletas pélvicas están ubicadas en una posición anterior; costillas pleurales en los primeros arcos hemales; el hipohial ventral forma una tapa ósea sobre la faceta anterior del ceratohial anterior; los poros supraorbitales están modificados de manera que los neuromastos se encuentran incrustados en surcos carnosos. Los machos se caracterizan por la presencia del gonopodio. La longitud máxima alcanzada es de 20 cm en longitud patrón en *Belonesox belizanus*, aunque la mayoría de las especies son mucho más pequeñas (Nelson, 2016).

De acuerdo a los análisis moleculares de Reznick *et al.*, (2017), la familia se originó en América del Sur, se diversificó a América Central y actualmente su distribución geográfica abarca desde el este de Estados Unidos hasta el noreste de Argentina (Reznick *et al.*, 2017). La familia se caracteriza por habitar en aguas dulces; sin embargo, se ha descrito la presencia de varias especies en aguas saladas y zonas costeras (Fricke *et al.*, Laan, 2023), pero sólo la especie *Poeciliopsis latidens* vive en aguas marinas verdaderas (Wischnath, 1993).

Fuera de sus áreas naturales de distribución, la familia Poeciliidae ha sido identificada como una de las principales familias de peces invasores de agua dulce

debido a las características y adaptaciones que poseen haciéndolas especies generalmente resistentes a presiones ambientales (Magalhães y Jacobi, 2017).

2.1.2. Género *Poecilia* (Bloch y Schneider, 1801)

El género *Poecilia* se encuentra dentro de la familia Poeciliidae y se caracteriza por su dimorfismo sexual y su colorido atractivo, lo que ha llevado a su popularidad en la acuariofilia. Habita principalmente aguas dulces, están distribuidas en ríos de Norte, Centro y Sur América (Froese y Pauly, 2023). De acuerdo con Rosen y Bailey (1963), los caracteres diagnósticos del género son:

Un cráneo, que cuando presenta parietales, son extremadamente pequeños y se limitan a la región posterior del frontal, adyacente o suprayacente a los parietales. La región posterior del frontal adyacente o supraoccipitales y epióticos; tienen procesos epióticos y supraoccipitales presentes y bien desarrollados, o estos últimos desarrollados de forma variable u obsolescente; post temporal bífida; dientes maxilares marginales comprimidos. Las costillas pleurales posteriores en el macho son no curvadas, extendiéndose oblicuamente hacia atrás, raramente dos o tres con las puntas ligeramente curvadas hacia delante. El suspensor gonopodial con dos gonapofisis bien desarrolladas, muy inclinadas hacia delante y sin uncini; cada gonapofisis tiene un par de paráfisis grandes cerca de su base, y una tercera gonapofisis no curvada de su base, una tercera gonapofisis presente como variación individual en *Poecilia reticulata*, *P. parae*, y *P. amazónica*. Complejo gonactinostal primario muy comprimido anteroposteriormente, parte anterior (elementos incorporados 2 y 3) en muchos casos separados de sección posterior (elemento 4 y alas laterales superiores e inferiores) por una muesca que se extiende hacia abajo desde el margen dorsal de una quinta a una cuarta parte de la altura del complejo; ligastilo de desarrollo variable, generalmente bastante pequeño y delicado o presente como uno o dos, raramente tres, pequeños huesecillos, en algunos casos ausente (Rosen y Bailey, 1963).

El gonopodio es bilateralmente simétrico desde la superficie ventral del radio 3, suele surgir un palpo grande y carnoso que puede envolver la mitad ventral del gonopodio, este palpo es inexistente en *P. heterandria* y *heterandria* y

diminuto en *P. elegans*; radio 3 con o sin serie de procesos espinosos distal o subdistalmente; rayo 4a raramente con unas pocas sierras subdistales; 4p típicamente con 10 o más sierras subdistales; rayo 5 frecuentemente terminado en la mitad ventral del gonopodio. subdistal; radio 5 frecuentemente terminado por pequeños, proyectada hacia atrás, que está unida a los segmentos subyacentes por tejidos conjuntivos intermedios; Aleta pélvica muy modificada, especializaciones que suelen afectar a los radios 1, 2, y 3, raramente los radios 4 y 5, el rayo 2 típicamente el más largo y con margen anterior dentado, serrado o crenulado dentado, serrado o crenulado, y mostrando una extensa anquilosis de los segmentos basales (Rosen y Bailey, 1963).

2.1.3 Diversidad de especies en el género *Poecilia*

De acuerdo a Froese y Pauly (2023) , en el género actualmente se encuentran 42 especies válidas, que incluye a : *Poecilia boesemani*, *Poecilia butleri*, *Poecilia catemaconis*, *Poecilia caucana*, *Poecilia caudofasciata*, *Poecilia chica*, *Poecilia dauli*, *Poecilia elegans*, *Poecilia formosa*, *Poecilia gillii*, *Poecilia hispaniolana*, *Poecilia hondurensis*, *islai poecilia*, *Poecilia kempkesi*, *Poecilia koperi*, *Poecilia kykesis*, *Poecilia latipinna*, *Poecilia latipunctata*, *Poecilia mandibular*, *Poecilia marcellinoi*, *Poecilia maylandi*, *Poecilia mechthildae*, *poecilia mexicana*, *Poecilia montana*, *Poecilia oscura*, *Poecilia orri*, *Poecilia parae*, *Poecilia petenensis*, *Poecilia picta*, *Poecilia reticulata*, *Poecilia rositae*, *Poecilia salvatoris*, *Poecilia sarrafae*, *Poecilia sphenops*, *Poecilia sulfuraria*, *Poecilia teresa*, *Poecilia vandepolli*, *Poecilia velifera*, *Poecilia vivípara*, *Poecilia waiapi*, *poecilia wandae* y *Poecilia wingei*. En el listado no se menciona a *Poecilia nelsoni*, pero la restitución por parte de Palacios *et al.* (2016) la colocan ahora como especie válida.

2.2. DESCRIPCIÓN ORIGINAL DE *POECILIA BUTLERI* (JORDAN, 1889)

La especie *P. butleri* fue descrita por Jordán (1889) a partir de seis especímenes, cinco machos y una hembra joven, colectados del río Presidio, cerca de Mazatlán. La especie fue nombrada en honor a su amigo el Sr. Armos W. Butler (Jordan, 1889). La traducción literal de la descripción original es la siguiente:

Aliado a *Poecilia dorii* Günther, pero con cuerpo más ancho y escamas grandes. Cabeza de $3\frac{1}{5}$ a $3\frac{3}{2}$ de largo hasta la base caudal; ancho $2\frac{2}{3}$ adulto a $3\frac{1}{5}$ juvenil. D.9, A.S. Escamas de 23 a 25. Longitud del adulto de 2 pulgadas. Del origen de la dorsal a mitad de la distancia entre la base caudal y la parte anterior del ojo y sobre la decima escama de la linea lateral; aletas moderadas, el rayo más largo del dorsal casi tan largo como la cabeza sin hocico; caudal escamoso en la base; pedúnculo caudal comprimido y ancho; color oliva uniforme, los jóvenes tenues matices cruzados oscuros; caudal con algunas manchas negras; dorsal con numerosos puntos negros redondos en ambos sexos.

2.3. DESCRIPCIÓN ORIGINAL DE *POECILIA NELSONI* = *PLATYPOECILUS NELSONI* (MEEK 1904)

Poecilia nelsoni fue descrita por Meek (1904), la traducción literal de la descripción original es:

$\frac{1}{2}$ pulgadas de largo; Cabeza $3\frac{3}{5}$; ancho $3\frac{1}{5}$; D. 7; A. 6; escamas 10-28. Cuerpo alargado, moderadamente comprimido; cabeza grande, hocico puntiagudo, $3\frac{1}{2}$ en la cabeza; interorbitales ligeramente convexos, dos en la cabeza; boca pequeña; dientes juntos, cónicos, con las puntas ligeramente dobladas hacia atrás; diámetro del ojo $3\frac{1}{2}$; origen de la aleta dorsal a medio camino entre la base caudal y el margen posterior del opérculo; aleta pectoral $1\frac{1}{6}$ en la cabeza; ventrales 2; aleta caudal redondeada; ancho mínimo del pedúnculo caudal $1\frac{2}{5}$

en la cabeza; sin línea lateral, muchas de las escamas con depresiones similares a poros en sus centros.

El autor describe su color como “oliváceo”, señala la existencia de algunas barras verticales tenues en la mitad posterior del cuerpo (Figura 1); el centro de cada escama de tono más claro, márgenes que forman tenues rayas longitudinales a lo largo de las filas de escamas. Meek (1904) describe observaciones que difieren entre sus especímenes “Uno de los especímenes tiene dos manchas similares a la tinta. En la base caudal; un segundo espécimen tiene solo el superior, los otros dos no tienen ninguno. Especímen más largo de 1.86 pulgadas”. Los especímenes para la descripción de esta especie fueron recolectados por E.W. Nelson en Papayo, Guerrero, cuenca del río Balsas el 20 de abril de 1903 (Meek, 1904).



Figura 1. Ilustración incluida en la descripción original de *Platypoecilus nelsoni* (Meek, 1904).

2.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *P. BUTLERI* Y *P. NELSONI*

P. nelsoni en sinonimia con *P. butleri* tenía una distribución en el oeste de México a través del ENTM desde el río Fuerte en el estado de Sonora, México, hasta El Salvador (Mateos, 2005).

Posterior a las inferencias de Mateos (2005) sobre la divergencia de *P. butleri* en 2 clados separados al norte y sur del ENTM, estudios realizados por Palacios *et al.*, (2016) restauraron a *P. nelsoni* como especie válida, posteriormente Palacios *et al.*, (2023) actualizó la distribución mexicana de ambas especies mostrando que *P. butleri* se encuentra restringida a la vertiente del pacifico, norte del ENTM, desde el estado de Nayarit al estado de Sinaloa y *P. nelsoni* en la vertiente del Pacífico al sur del ENTM, desde el estado de Jalisco hasta el estado de Chiapas.

2.5. ESPECIES CRÍPTICAS

La existencia de especies crípticas fue reconocida gracias al desarrollo de técnicas moleculares, que actualmente funcionan como una herramienta de análisis de caracteres más profundos, ya que permiten estudiar las diferencias genéticas entre poblaciones o individuos y su aplicación, ha permitido resolver la incertidumbre sobre el estado taxonómico de muchas especies (Bickford *et al.*, 2007).

2.5.1. Relevancia del origen del crípticismo y su afección en la conservación y manejo de especies

Para Bickford *et al.*, (2007) las especies crípticas pueden haber evolucionado a partir de una especie ancestral común, pero a lo largo del tiempo, han adquirido diferencias genéticas que las separan en distintos linajes evolutivos; a menudo, estas diferencias se deben a procesos como la divergencia, la adaptación o especiación.

Es importante destacar que la existencia de especies crípticas tiene implicaciones en la conservación y el manejo de la biodiversidad, afectando la priorización de hábitats para conservación, la categorización bajo un estatus de riesgo (al determinar si se trata de una especie o un complejo de especies) y por ende requerir de diferentes estrategias para asegurar su conservación (Bickford *et al.*, 2007; Theodoridis *et al.*, 2019). Tal es el caso del manejo de plagas, en donde se considera el mismo supuesto, donde una especie podría ser realmente un complejo

de especies, por lo cual requeriría implementar diferentes y nuevas estrategias para asegurar su control (Geoffroy *et al.*, 2016; M'hamed *et al.*, 2016).

2.6. ESPECIES HERMANAS

Las especies hermanas son dos o más especies que comparten un ancestro común más reciente entre ellas que con cualquier otra especie. En otras palabras, son especies que han evolucionado a partir de una especie ancestral común y que comparten un linaje evolutivo cercano. Las especies hermanas suelen estar estrechamente relacionadas y comparten características genéticas y morfológicas similares. Sin embargo, a pesar de tener un ancestro común, han experimentado cambios evolutivos suficientes como para ser consideradas especies separadas (Knowlton, 1986).

Probablemente William Derham (1718) fue quien abrió la conversación acerca de los procesos de especiación y los avances en la biología evolutiva hace casi 300 años, desde el primer reconocimiento documentado de especies hermanas, identificando diferencias entre varias especies de aves del género *Phylloscopus* (Winker, 2005); antes de que las técnicas de análisis genético se realizarán en estudios de taxonomía y sistemática.

2.7. MÉTODOS TRADICIONALES DE DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE PECES

Los métodos tradicionales de delimitación de especies de peces se basan principalmente en características morfológicas, anatómicas y de comportamiento de los individuos. Algunas de las técnicas y enfoques comunes utilizados en los métodos tradicionales incluyen:

- **Morfología externa:** Analiza las características externas de los peces, como forma del cuerpo, coloración, tamaño y proporciones corporales. Estos rasgos pueden proporcionar pistas sobre la identidad de una especie y ayudar a distinguirla de otras especies (Soria *et al.*, 2024; Olmos, 2018; Nico *et al.*, 1987).

- **Morfología interna:** Examina las estructuras internas, como esqueleto, dientes, órganos y características de los sistemas digestivo, respiratorio y reproductor. Estas características pueden ser útiles para diferenciar especies y establecer relaciones filogenéticas (Concejalia, 2011).
- **Otras características:** Analiza características específicas de las escamas, aletas y otros órganos, como número de radios en las aletas o la presencia de espinas. Estas características pueden ser únicas para cada especie y utilizarse para su identificación (Miller, 1948).

2.7.1. Datos merísticos

Los datos merísticos se utilizan en la descripción y clasificación de los peces, aunque este tipo de datos en peces se usan desde hace mucho tiempo, la contribución de Miller (1948) fue importante al establecer un conjunto de datos merísticos estándar que se ha utilizado ampliamente en la ictiología. Esto ha permitido una mayor consistencia y comparabilidad en los estudios de peces y ha facilitado el avance del conocimiento en este campo. En la Figura 2 se muestran algunos de los datos merísticos que están en el listado original de Miller (1948), las traducciones literales son:

- **ALETAS DORSAL Y ANAL:** El último radio se considera siempre como un rayo doble, dividido hasta la base, los recuentos para estas aletas de *Cyprhodon* es uno menos.
- **ALETAS PECTORALES:** Se cuentan todos los radios de ambas, incluidos los rudimentos, a menudo minúsculos, del borde inferior de la aleta, el radio más inferior suele estar unido al de alado y puede necesitar una disección para descubrirlo.
- **ALETAS PÉLVICAS:** Se enumeran todos los radios de ambas, con especial atención al más interno, que a menudo se representa como una astilla de cartílago o un diminuto muñón.
- **ALETA CAUDAL:** El recuento se hace con el número de radios principales, los radios ramificados más dos (o un radio no ramificado a cada lado).
- **ESCAMAS DE LA SERIE LATERAL:** Se cuentan desde la primera en contacto con la cintura escapular, hasta la primera en la base estructural de la aleta

caudal. La primera escama contada se encuentra justo por encima y un poco por detrás del ángulo opercular, la última se determina moviendo la cola hacia atrás y hacia adelante y observando dónde el pliegue así formado está en contacto con la escama. Si el pliegue se encuentra cerca de la mitad de la escama o posteriormente, la escama se incluye en el recuento, de lo contrario se excluye.

- En los conteos se debe prestar atención si una escama está regenerada, pues se ha comprobado en *Cyprinodon*, que una sola escama regenerada ocupa a menudo el espacio que antes ocupaban dos escamas, lo que resulta en que el recuento de escamas sea menor; en ese caso, se excluye.
- CONTEO DORSAL A PÉLVICO: Los *Cyprinodontes* carecen de una línea lateral definida, por lo que el conteo se hace a partir de la línea lateral, desde la escama situada justo en el ángulo de la aleta pélvica hasta la escama situada justo al lado de la aleta pélvica hasta la primera justo al lado (pero no anterior) del origen de la aleta dorsal.
- CONTEO DORSAL A ANAL: Se hace desde la pequeña escama (o escamas) situadas en el ángulo de la aleta anal hasta esta misma escama.
- CONTEO PREDORSAL: Incluye las escamas que intersecan una línea recta a lo largo del dorso entre el hocico y el origen de la aleta dorsal. La primera escama (o, por lo general, un par de dos escamas muy pequeñas situadas una al lado de la otra y ocasionalmente difíciles de ver) se encuentra en el hocico, la cuarta escama (por lo general agrandada y no imbricada) casi invariablemente se encuentra en parte por encima y en parte por detrás del borde posterior de la órbita. Se cuentan todas las escamas que se superponen de forma clara e inequívoca a la línea del dorso en sus superficies expuestas.
- CONTEO DE LAS ESCAMAS ALREDEDOR DEL CUERPO: Comienza con la octava escala de la serie lateral y se hace en zigzag pasando sobre el dorso aproximadamente una hilera de escamas por delante de la aleta dorsal, y sobre el abdomen aproximadamente una hilera de escamas por delante de las aletas pélvicas.
- LAS ESCAMAS ALREDEDOR DEL PEDÚNCULO: Se cuentan según el método seguido para el recuento alrededor del cuerpo; el recuento se inicia con aproximadamente la sexta desde la última escama de la serie lateral.

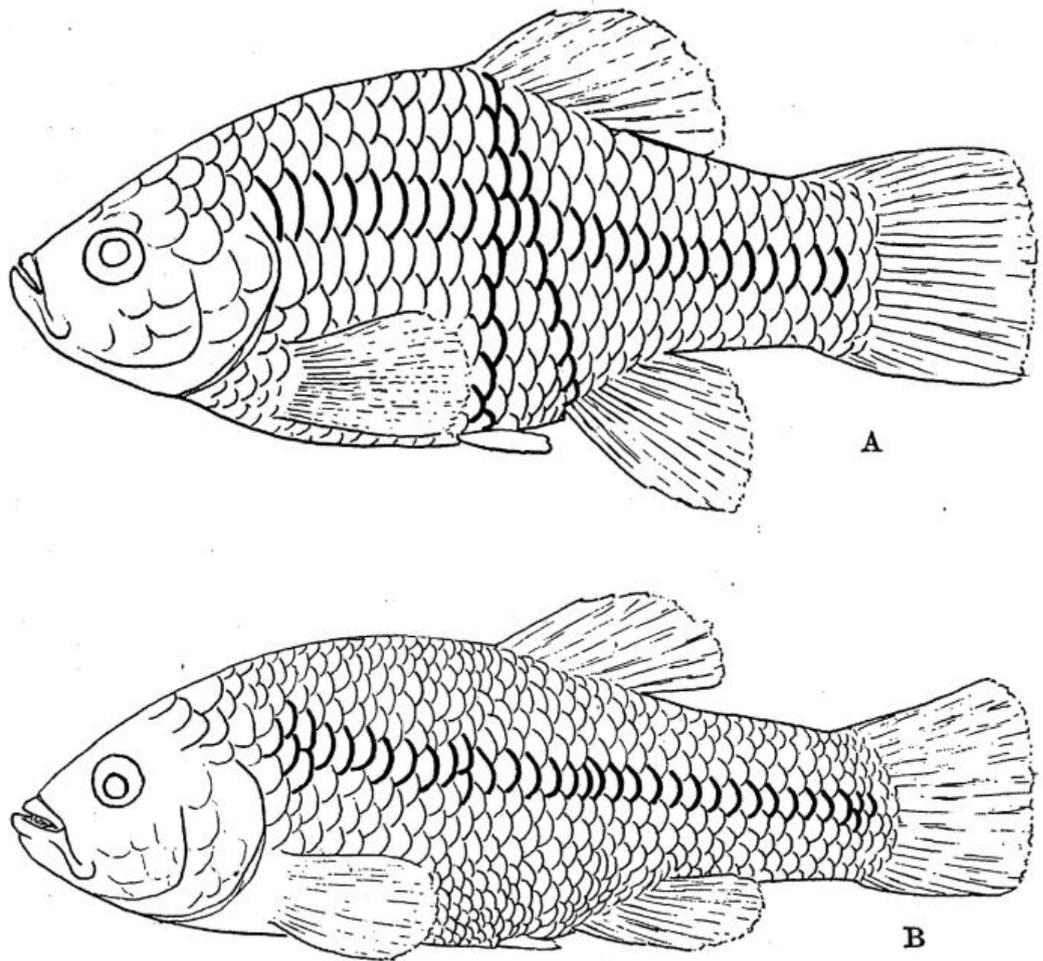


Figura 2. Ilustración original de Miller (1945) de 2 especies de *Cyprinodon*, para ilustrar los métodos de recuento de escamas en las series lateral, dorsal a pélvica y dorsal a anal. Dibujado por Grace Eager. A. *Cyprinodon nevadensis nevadensis*: 26 escamas laterales. B. *Cyprinodon salinus*: 33 escamas laterales.

Los datos merísticos proporcionan información importante para la identificación y clasificación de las especies de peces, ya que pueden variar entre diferentes especies y ayudar a distinguirlas. Además, los datos merísticos también pueden utilizarse en análisis filogenéticos y estudios de variación intraespecífica (Gacitúa *et al.*, 2008).

Es importante tener en cuenta que los datos merísticos establecidos por Miller (1948) no son fielmente usados y dependiendo el autor o el estudio específico pueden agregarse datos merísticos o tener variaciones en su aplicación.

2.7.2. Datos morfométricos

A lo largo del tiempo, los investigadores han utilizado diversas técnicas para medir y cuantificar las características morfológicas de los peces. Estas técnicas se remontan a varios siglos atrás, desde los primeros intentos de clasificar y describir las especies de peces, siguiendo lo descrito por Humphries *et al.* (1981), Strauss y Bookstein (1982), Bookstein *et al.* (1985) y Winans (1987), los investigadores han reconocido la importancia de las características morfológicas para diferenciar y agrupar las especies.

Para obtener datos morfométricos (Bookstein *et al.*, 2014), se pueden obtener mediciones lineales, de proporción y de relaciones entre diferentes partes del cuerpo, se consideran medidas lineales a aquellos puntos específicos del cuerpo del pez, como la longitud estándar, longitud total, longitud de la cabeza, longitud de aletas, entre otros. Estas medidas se registran utilizando calibradores o reglas precisas y se pueden normalizar dividiéndolas por la longitud estándar y las medidas basadas en proporciones y relaciones se calculan entre diferentes partes del cuerpo del pez, como la longitud de la cabeza en relación con la longitud estándar, la longitud de la aleta dorsal en relación con la longitud total, etc. Estas proporciones son importantes ya que proveen información adicional sobre la forma y la estructura del pez (Bookstein *et al.*, 2014).

Miller (1945) estableció un conjunto de datos estándar que se siguen usando actualmente en la ictiología en estudios de sistemática, evolución, ecología y conservación de peces (Bookstein *et al.*, 2014). En la figura 3 se observan algunos de los datos que están en el listado original de Miller (1948), cuyas traducciones literales son:

- LONGITUD ESTÁNDAR (SL): Distancia desde la punta del hocico hasta la base estructural de la aleta caudal. El límite anterior de esta medida es la punta de los premaxilares, en posición retraída.
- LONGITUD PRE DORSAL (PDL): Desde la base del primer rayo dorsal hasta la punta de los premaxilares.
- LONGITUD PREPELVICA (PPL): Desde la base interna de la aleta pélvica hasta la punta de los premaxilares.

- ORIGEN ANAL A BASE CAUDAL (AOTOB): Distancia entre el origen del primer rayo anal y la base estructural de la aleta caudal en la línea media del cuerpo.
- PROFUNDIDAD MÁXIMA DEL CUERPO (BGD): Distancia vertical máxima entre el dorso y la superficie ventral del abdomen y la superficie ventral del abdomen, medida generalmente sobre la pelvis.
- ANCHURA MÁXIMA DEL CUERPO (BGW): Distancia horizontal máxima entre la mayor distancia horizontal entre los lados del cuerpo, medida sobre la espalda, generalmente justo detrás de la cabeza.
- LONGITUD DE LA CABEZA (HL): Medida desde el margen posterior del opérculo (de la solapa opercular, si existe). Se mide desde el margen posterior del opérculo (de la aleta opercular, si existe) hasta la punta de los premaxilares retraídos.
- PROFUNDIDAD DE LA CABEZA (HD): Distancia vertical máxima entre el istmo y la parte superior de la cabeza, directamente por encima del ángulo superior. De la cabeza directamente por encima del ángulo superior del opérculo.
- ANCHURA DE LA CABEZA (HW): Distancia horizontal máxima entre los opérculos, medida desde arriba.
- PEDÚNCULO CAUDAL, LONGITUD (CPL): Distancia entre la base del último radio de la aleta anal y la base estructural de la aleta caudal en la línea media (en los peces estudiados hay poca o ninguna membrana detrás del último rayo anal).
- PEDÚNCULO CAUDAL, MENOR PROFUNDIDAD (CPLD): Distancia vertical a través de la parte más densa del pedúnculo caudal.
- INTERORBITAL, MENOR ANCHURA ÓSEA (IOLBW): Mínima distancia entre los bordes óseos de las órbitas. óseos de las órbitas.
- LONGITUD DEL MORRO (SNL): Distancia entre el borde carnoso de la órbita y las premaxilares retraídas.
- LONGITUD DEL ORBITAL (OL): La distancia mayor de forma horizontal entre los bordes carnosos del orbital.
- LONGITUD DE LA MANDÍBULA SUPERIOR (UJL): Distancia entre el extremo distal del maxilar derecho y la punta de la mandíbula.

- ALETAS DORSALES (DFBL) Y ANALES (AFBL), LONGITUD BASAL: Hacia delante hasta la base estructural del primer rayo. Este punto se determina deslizando la punta de los calibradores anteriormente a lo largo de la prolongación del origen dorsal hasta la base estructural.

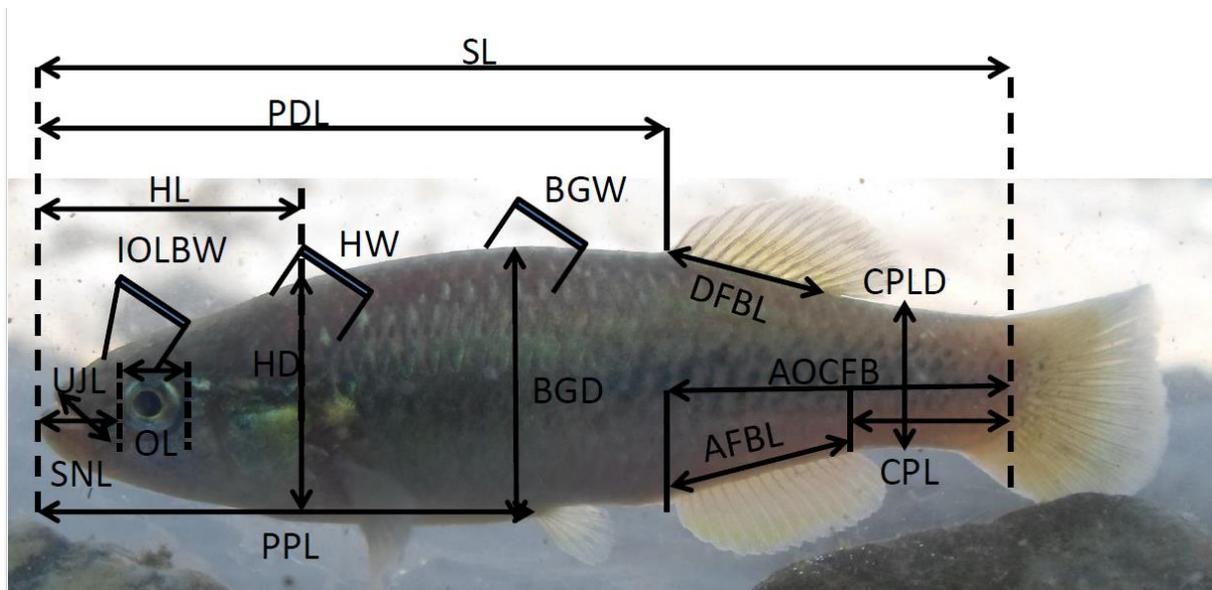


Figura 3. Ilustración sobre la toma de datos morfométricos en peces, basada en Miller (1948). (ilustración por: Wilfredo A. Matamoros).

2.7.3. Comportamiento reproductivo

El comportamiento reproductivo se considera un carácter difícil por todo lo que implica la toma de datos, la posible variabilidad ambiental y la naturaleza complicada del comportamiento; sin embargo, es indispensable en muchas ocasiones para reconocer especies (Coyle, 1998).

Estudiar intraespecíficamente el comportamiento reproductivo de los peces es de suma importancia, ya que permite identificar el tipo de cortejo y la forma de reproducción, información que ha sido utilizada durante mucho tiempo y relevantes en la taxonomía de los peces, ya que estos comportamientos pueden ser específicos de cada especie y fungir como mecanismos de aislamiento y por ende ayudar en su identificación (Nelson *et al.*, 2016; Mayden, 1997; Avise, 2000; Smith *et al.*, 2008).

2.7.4. Limitaciones del método tradicional de delimitación de especies

Si bien los métodos tradicionales de delimitación de especies de peces son importantes y han sido utilizados con éxito durante mucho tiempo, también presentan limitaciones para comprender las estimaciones de la biodiversidad, la gestión de la conservación, los patrones evolutivos así como los procesos (Traldi *et al.*, 2020), ya que algunas especies pueden mostrar variaciones morfológicas dentro de ellas debido a factores como la plasticidad fenotípica o la influencia del ambiente, además, en casos de especies crípticas estas diferencias morfológicas no son evidentes (Bickford *et al.*, 2007).

2.8. MÉTODOS ACTUALES DE DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE PECES

La delimitación de especies es un proceso complejo y los métodos utilizados pueden variar según las características particulares de los peces estudiados y los objetivos de la investigación; sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas y enfoques continúa avanzando, lo que permite mejoras en la precisión y la fiabilidad de la delimitación de especies en peces. Actualmente los métodos más usados son filogeográficos y coalescentes, ya que ayudan a comprender la evolución de la variación genética entre especies, adicionando información que no podían obtener de los métodos clásicos (Betancourt *et al.*, 2019).

2.8.1. Análisis Integrado de Distribución Geográfica y Filogeografía

Las distribuciones geográficas de las especies integrando datos geográficos, ecológicos, genéticos, modelando la evolución y la dispersión a través del espacio y el tiempo, ayudando a identificar patrones de migración, aislamiento y colonización, permiten la reconstrucción de eventos históricos, como glaciaciones, cambios climáticos y barreras geográficas que puedan haber dado lugar a la diferenciación de poblaciones de especies putativas, y de esta forma esclarecer su diferencia genética en diferentes niveles geográficos (Riddle *et al.*, 2008 y Ríos *et al.*, 2017).

2.8.2. Técnicas moleculares de identificación

La identificación genética de especies se basa en el aislamiento y análisis de los marcadores de ADN que presentan variaciones entre especies, pero son generalmente conservados dentro de la especie, ya que su tasa de mutación coincide aproximadamente con la tasa de evolución de las especies (Hebert *et al.*, 2004).

En animales, los marcadores más comúnmente usados son las regiones génicas dentro del ADN mitocondrial. Los haplotipos mitocondriales resultan de gran utilidad en la identificación de especies ya que no sufren recombinación y se heredan de forma uniparental. El resultado de esto es una diversidad intraespecífica reducida dado que las especies están aisladas reproductivamente (Hebert *et al.*, 2004).

Se utiliza, en particular, el citocromo B (Cytb) (Bottero y Dalmaso, 2010; Dooley *et al.*, 2004; Sevilla *et al.*, 2007), el citocromo oxidasa I (COI) y la región control mitocondrial (D-loop) (Hebert *et al.*, 2003a y b). También se han usado marcadores mitocondriales adicionales que incluyen los genes que codifican para los ARN ribosomales (ARNr). Para el gen COI, por ejemplo, la tasa de evolución molecular permite distinguir no sólo especies próximas sino también grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Hebert *et al.*, 2004; Hogg y Hebert, 2004; Ward *et al.*, 2005).

2.8.3. Filogenética molecular

La filogenética molecular consiste en estudiar y comprender aquellas relaciones evolutivas que existen entre los seres vivos y junto con ello conocer los tiempos en los que pudo haber ocurrido la diversificación de cualquier especie en particular (Wong, 2016). El genoma es el empaquetamiento donde se encuentra contenido el material genético. A lo largo del tiempo, los genomas evolucionan debido a la acumulación gradual de mutaciones, esto permite que cada especie sea diferente, y que sea debido a esta diferencia en la secuencia de nucleótidos que podamos llegar a definir una aproximación de que tan reciente dos genomas en comparación pudieron haber compartido un ancestro común (Brown, 2002). Por lo que los análisis comparativos de las secuencias moleculares se han convertido en el método con

mayor peso para estimar las relaciones evolutivas entre las especies (Abascal *et al.*, 2014).

Las primeras nociones acerca de emplear secuencias moleculares para poder inferir las relaciones genealógicas entre las especies, fue propuesta por primera vez por Francis Crick (1958), y posteriormente la idea fue reforzada por Zuckerkandly y Pauling (1962), quienes proponían que el tiempo en el cual pudo haber divergido una especie podría estimarse a partir de comparar las distancias o diferencias entre dichas secuencias (Pace *et al.*, 2012; Abascal *et al.*, 2014).

2.8.4. Red de haplotipos

Una red de haplotipos es un método intuitivo que permite visualizar las relaciones entre genotipos individuales a nivel poblacional, visualizando las relaciones genealógicas a nivel intraespecífico y de esta forma realizar inferencias acerca de identidad, biogeografía e historia de las poblaciones (Leigh *et al.*, 2015).

Existen diversos métodos para realizar diseños de redes de haplotipos (Bandelt *et al.*, 1999; Clement *et al.* 2002; Cassens *et al.*, 2005; Manolopoulou *et al.*, 2011). Actualmente los diseños más eficientes son automatizados realizados por softwares como TCS (Clement *et al.*, 2000), HapStar (Teacher y Griffiths, 2010), POPART (Leigh *et al.*, 2015), fastHaN (Chi *et al.*, 2023) y Hapsolutely (Vences *et al.*, 2024) debido al ahorro de tiempo de creación, así como la eliminación de sesgos inducidos por el hombre en la representación de las figuras (Teacher y Griffiths, 2010).

2.8.5. Árbol filogenético de inferencia bayesiana

Los árboles filogenéticos actualmente son indispensables en estudios biológicos para descubrir especies divergentes comprendiendo la evolución, nuevos caracteres, la adaptación molecular, para comprender la evolución de los caracteres morfológicos y reconstruir los cambios demográficos en los últimos tiempos (Kapli *et al.*, 2020).

Estos árboles son representaciones gráficas de las relaciones evolutivas entre diferentes especies, poblaciones o genes, ya que todas las especies han estado vinculadas a través de ancestros comunes. En la última década se han creado

diferentes metodologías para construir árboles filogenéticos basados en secuencias de proteínas (Robinson y Foulds, 1981).

Dado que actualmente existen diversas metodologías para inferencia filogenética, establecer metas, identificar y cuidar los datos a usar son indispensables para evitar errores y crear árboles más precisos (Kapli *et al.*, 2020). Los árboles de inferencia bayesiana se realizan por medio de métodos estadísticos que se basan en modelos de evolución molecular, los cuales expresan un modelo probabilístico explícito, que permite analizar diferentes tipos de caracteres a nivel molecular (frecuentemente secuencias de nucleótidos de DNA) para buscar el mejor árbol, ajustándose a los datos, calculando los valores de probabilidad de los datos relacionados con cada árbol posible, esto incluye un valor de verosimilitud, pero lo transforma en una probabilidad posterior que indica el grado de creencia de un determinado árbol con respecto a los datos (Scheepens, 2018 y Peña, 2024).

2.8.6. Morfometría geométrica en peces

Los avances tecnológicos han facilitado la obtención y el análisis de datos morfométricos. La utilización de técnicas de imagen, como la fotografía digital y la digitalización en 3D, ha permitido una medición más precisa y detallada de las características morfológicas de los peces (Bookstein *et al.*, 2014). Además, el desarrollo de métodos estadísticos y análisis multivariados, ha ampliado la capacidad de analizar y comparar datos morfométricos entre diferentes especies y poblaciones de peces.

La aproximación de la morfometría geométrica se basa en la variación morfológica de las distancias medidas a partir de un entramado entre una serie de hitos corporales, y del recuento de los elementos que componen las estructuras a lo largo, o en partes específicas del cuerpo del pez (Humphries *et al.*, 1981, Strauss y Bookstein 1982, Bookstein *et al.*, 1985, Winans, 1987 y Cadrin, 2000). Teóricamente esta caracterización sistemática de la geometría de la forma del pez aumenta la posibilidad de extraer diferencias morfométricas con un significado biológico dentro y entre especies (Winans, 1987).

Es importante tener en cuenta que la elección de los datos y los métodos utilizados pueden variar según los objetivos específicos del estudio y las características de los peces bajo investigación. Además, los investigadores a menudo adaptan los enfoques existentes o desarrollan nuevos métodos según sus necesidades y avances tecnológicos (Winans, 1987)

2.8.7. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es probablemente la técnica estadística multivariante más popular y se utiliza en casi todas las disciplinas científicas. También es probable que sea la técnica multivariante más antigua. De hecho, su origen se remonta a Pearson (1901), pero su instancia moderna fue formalizada por Hotelling (1933) que también acuñó el término componente principal.

El PCA es un método estadístico y gráfico de análisis de datos, la técnica multivariada analiza una tabla de datos en la que las observaciones se describen mediante varias variables dependientes cuantitativas interrelacionadas. Su objetivo es extraer la información importante de la tabla, representarla como un conjunto de nuevas variables ortogonales llamadas componentes principales, mostrar el patrón de similitud de las observaciones y de las variables como puntos en los mapas (Abdi y Williams, 2010).

2.8.8. Análisis de variables canónicas (CVA)

Este análisis en comparación con el PCA, maximiza la separación de grupos especificados a *priori*, creando nuevas variables que tienen conjunción con los análisis multivariados de la varianza, que pueden determinar en donde se encuentran las diferencias más importantes entre las medias de las poblaciones (Ángulo, 2021). Este análisis no es ortogonal por lo que cada eje discriminante no es rígido y rotan independientemente de cada eje, permitiendo detectar cuales son las mediciones lineales que más contribuyen a la distinción entre grupos (De Luna, 2020).

III. ANTECEDENTES

Poecilia butleri es una especie de pez dulceacuícola que fue originalmente descrita por Jordan en el año 1889. En su estudio examinó cinco ejemplares de esta especie, cuatro machos y una hembra, los cuales fueron recolectados en el río Presidio, ubicado en las cercanías de Mazatlán, Sinaloa.

Su descripción fue un hito importante en el campo de la ictiología, Jordan (1889) realizó un análisis exhaustivo a través de detalles esenciales sobre sus características distintivas, incluyendo su apariencia física, comportamiento y hábitat natural, lo que permitió el reconocimiento y la clasificación de esta especie en particular. Su hallazgo sentó las bases para investigaciones posteriores sobre la especie y su papel en los ecosistemas acuáticos.

Poecilia nelsoni, fue descrita en el año 1904 bajo el nombre de *Platypoecilus nelsoni*. El estudio se basó en la recolección de cuatro especímenes de esta especie, los cuales fueron capturados en la cuenca del río Balsas, ubicada en Guerrero, estos peces fueron sometidos a un análisis detallado utilizando datos clásicos de caracteres morfológicos para la descripción de peces (Meek, 1904).

Sin embargo, a lo largo del tiempo, existieron cambios en la clasificación taxonómica de *Poecilia nelsoni* = *Platypoecilus nelsoni*. Miller (1957) colocó a *P. nelsoni* como sinónimo de *P. butleri*, basado en un examen de topotipos (UMMZ-178472).

Años después en 1963, un estudio realizado por Rosen y Bailey sobre los poecilidos, examinó la estructura, zoogeografía y sistemática, colocando a *Poecilia nelsoni* como sinónimo de *Poecilia sphenops* Valenciennes (Rosen y Bailey, 1963).

Más adelante, se realizó un estudio de caracteres morfométricos y fenotípicos, realizado en el complejo *Poecilia sphenops* en México (Schultz y Miller, 1971), en el que se encontró evidencia de que *Poecilia butleri* (= *P. nelsoni*) era una especie separada de *Poecilia sphenops*.

Miller (1983) realizó una lista de verificación y de claves de los peces *Mollienesia* de México que él consideraba válidas. El análisis se realizó a base de

topotipos y fue entonces cuando oficialmente se colocó a *P. nelsoni* como sinónimo de *P. butleri*. El estudio ofrece una sinonimia parcial de algunos miembros del complejo *P. sphenops*, debido a que en ese momento el número de especies del grupo era aún indeterminado y el estatus de algunas formas nominales también.

En su trabajo, Miller (1983) enumera las especies con referencia a su descripción original, localidad, tipo, área de distribución, ilustraciones útiles y bibliografía posterior de importancia biológica. Para la sinonimia de *P. nelsoni* con *P. butleri* menciona un área de distribución: “aguas costeras dulces a salobres desde la cuenca del bajo Río Fuerte, al sureste de Álamos, Sonora, México, a lo largo de la costa a través del oeste y sur de México hasta el sur de Guatemala”.

Posteriormente Parenti *et al.* (1999) en una revisión filogenética sistemática completa de la familia Poeciliidae, realizó un análisis minucioso de los especímenes de referencia, con holotipos y paratipos en donde se incluyen sintipos de *P. butleri* que de hecho eran registros de Miller (1957) sobre *P. butleri* al sur de México, en la revisión se menciona de nuevo la sinonimia entre *P. nelsoni* y *P. butleri* basándose en el estudio que realizaron Schultz y Miller en 1971.

Mateos (2002 y 2005) hizo las primeras inferencias sobre la validez *P. butleri* y *P. nelsoni*, identificando eventos geológicos potenciales en la parte occidental del ENTM que causaron vicarianza en géneros de la Familia Poeciliidae, sus análisis filogenéticos señalan dos linajes pronunciadamente divergentes para especie de *P. butleri*. Los dos linajes se agruparon en clados monofiléticos recíprocos (en ese momento *P. butleri* se encontraba en sinonimia con *P. nelsoni*), por lo que infieren un linaje al norte (*P. butleri*) del ENTM y uno al sur (*P. nelsoni*), y sugiere un análisis molecular y morfológico profundo en la especie para poder separarlas, ya que incluso podrían considerarse dos especies evolutivamente independientes (Mateos *et al.*, 2002; Mateos, 2005).

Con los años siguieron nuevas reclasificaciones, entre ellas Poeser (2011) y Meyer (2015) para el subgénero *Mollinesia*. Estos cambios en la clasificación reflejan las dudas y las investigaciones en curso sobre el grupo en general al que pertenece el género *Poecilia*, el subgénero *Mollinesia* y por la tanto las especies *P. butleri* y *P. nelsoni*.

Para aclarar estas dudas y obtener una comprensión más precisa de las relaciones, Palacios *et al.*, (2016) llevaron a cabo un estudio filogenético basado en análisis moleculares, revelando los estados de varias especies dentro del subgénero *Mollienesia* y confirmando que *P. nelsoni* es una especie válida y molecularmente separada de *P. butleri*. Estos cambios en la clasificación taxonómica reflejan los avances en la investigación científica y la comprensión de las relaciones evolutivas entre las especies. Es importante tener en cuenta estas actualizaciones para obtener una visión completa y precisa de la taxonomía y la historia de estas especies.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general:

- Determinar caracteres morfológicos y moleculares diagnósticos de *Poecilia butleri* y *Poecilia nelsoni*.

Específicos:

- Identificar los caracteres morfométricos y merísticos que delimiten a *P. nelsoni* y *P. butleri*.
- Aplicar la morfometría geométrica para delimitar a *P. nelsoni* y *P. butleri*.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre ejemplares de *Poecilia butleri* y *Poecilia nelsoni* a lo largo de su distribución geográfica en México.

Hipótesis: *Poecilia butleri* y *P. nelsoni* son especies hermanas entre ellas y crípticas. La condición de cripticismo no permite diferenciarlas morfológicamente. En este estudio se hipotetiza que individuos de ambas especies no presentarán diferencias significativas en análisis multivariados utilizando caracteres merísticos y morfométricos, y que, como único recurso de diagnóstico serán sus diferencias moleculares y geográficas.

V. ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio corresponde a la distribución de las especies en México (Figura 4) en base a la localización de los registros de colecta de la Colección de Peces del Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal, así como de los puntos de colecta de las secuencias genéticas obtenidas en Genbank (Anexos).

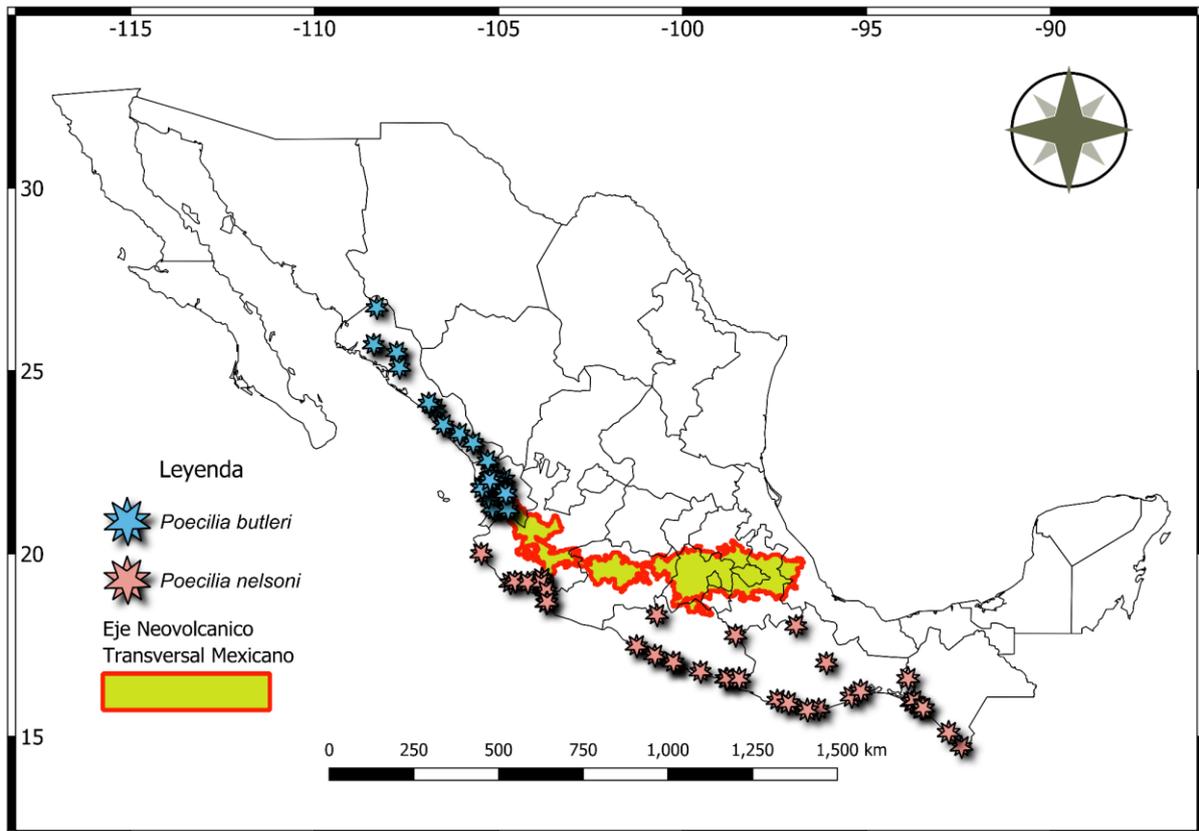


Figura 4. Mapa de distribución de los puntos de colecta de los lotes, así como de las secuencias del Cytb de *P. butleri* y *P. nelsoni*.

La zona de estudio es particular y relevante, debido a la confluencia entre las regiones Neártica y Neotropical, que se distinguen entre sí por poseer características biológicas, fisiográficas, así como climáticas (Vivó, 1943; Escalante, 2009). La región Neotropical comprende Centroamérica y gran parte de Sudamérica, el clima de esta región se caracteriza por ser tropical húmedo y subhúmedo, además, su fisiografía comprende principalmente cordilleras, serranías y mesetas volcánicas, siendo entre las más conocidas la Sierra Madre de México y Guatemala y el Eje Neovolcánico Transversal (Morrone, 2001; Hartshon, 2004).

La región Neártica se encuentra en la parte de Norteamérica al norte del eje Neovolcánico transversal mexicano que incluye el norte de México (Rico *et al.*, 2022). Mantiene una composición de climas templados y fríos, aunque, también existen zonas con climas áridos subtropicales que son más específicos del sur de Estados Unidos y el norte de México (Morrone, 2001; Morrone, 2005).

El límite entre ambas regiones es peculiar debido a que en ella se presenta un área de superposición biótica Neártica y Neotropical (Rico *et al.*, 2022), que ha sido denominada como la Zona de Transición Mexicana (Morrone y Márquez, 2001; Halffter, 2003; Morrone, 2004; Miguez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

P. butleri y *P. nelsoni* tienen una distribución a lo largo de la costa oeste de México que es notoriamente dividida por el ENTM, en donde *P. butleri* existe al norte en la región Pacífico Norte pasando por los estados de Nayarit y Sinaloa, mientras que *P. nelsoni* se distribuye al sur del ENTM en la región del Pacífico sur en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Palacios *et al.*, 2016).

La región Pacífico Norte tiende frecuentemente a presentar precipitaciones abundantes y torrenciales en las cuencas, debido a sistemas ciclónicos en el verano, así como por frentes fríos y parecidos durante el invierno. Los sistemas ciclónicos afectan prácticamente a toda la región, pero los invernales tienen mayor presencia en la parte norte, en especial, en la cuenca del río Fuerte. En la región, el estado de Sinaloa es el más expuesto a este tipo de fenómenos, seguido de Nayarit, debido a que sus territorios incluyen vastas zonas de planicies costeras. Aunado a ello, el fenómeno de El Niño ha tenido efectos sobre toda la República Mexicana, ocasionando lluvias de gran magnitud, fuera de temporada, en las cuencas de los ríos San Pedro y Acaponeta en Nayarit y El Fuerte, Presidio, Baluarte y Sinaloa, Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2009).

La cuenca del río Balsas presenta llanuras de inundación reducidas debido a que la barrera montañosa está localizada muy cerca del litoral del Pacífico, por lo que no presenta problemas de inundación de gran magnitud debido a la pendiente generalmente grande y a la facilidad que presenta de drenaje. Se encuentra delimitada por dos provincias fisiográficas o morfotectónicas: el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano al norte y La Sierra Madre del Sur al sur (CONAGUA, 2009).

Las formaciones del ENTM, están predominantemente formadas por calizas, esquistos y areniscas del Cretácico inferior, que estuvieron sujetas a levantamientos por plegamientos y a grandes fracturas por donde se colaron materiales ígneos. A fines del Mesozoico y principios del Cenozoico estas formaciones cubrieron la zona del ENTM modificando profundamente el relieve, esta inmensa estructura fisiográfica presenta una gran continuidad orográfica, con puertos muy elevados y parteaguas ininterrumpidos. En general, la cuenca del río Balsas por su posición geográfica, características orográficas y accidentada topografía terminó por convertirse en un límite climático y biogeográfico para la flora y la fauna de México donde las interrelaciones son complejas, Instituto Nacional de Ecología (INECOL, 2007).

La región Pacífico Sur comprende las cuencas y estados de Guerrero, Chiapas y Oaxaca, tienen un relieve predominante de montaña y de tierras altas de meseta, determinado por las cordilleras Sierra Madre del Sur, la Sierra de Juárez, la Sierra de Chiapas y la Meseta de Chiapas, presentando frecuentes inundaciones a consecuencia de los desbordamientos de cauces provocados por lluvias intensas. La parte oriental del estado de Oaxaca es la única con relieve predominantemente llano, en la zona del Istmo de Tehuantepec (CONAGUA, 2009).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

6.1.1. Morfometría lineal

El material biológico utilizado para los análisis morfológicos procede de ejemplares depositados en 22 lotes de la Colección de Peces del Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal (ECO-SC-P). Se seleccionaron todos los ejemplares de los lotes etiquetados como *P. butleri* y *P. nelsoni* que contaran con datos concisos del sitio de colecta además de estar en óptimas condiciones para la toma de datos, es decir, estar en posición recta, contar con aletas, gonopodio (machos) y escamas completas.

La identidad taxonómica de los ejemplares fue definida de acuerdo a la procedencia de los lotes, siguiendo la clasificación taxonómica basada en el estudio de Palacios *et al.*, (2016) que colocan a *P. butleri* al norte y a *P. nelsoni* al sur del ENTM a lo largo de la costa oeste de México.

Para la toma de datos por ejemplar se usaron los caracteres morfométricos, (Cuadro 1, Figura 5 y 6) y merísticos (Cuadro 2, Figura 7). Los datos merísticos son modificados basados en Matamoros y Schaefer (2010).

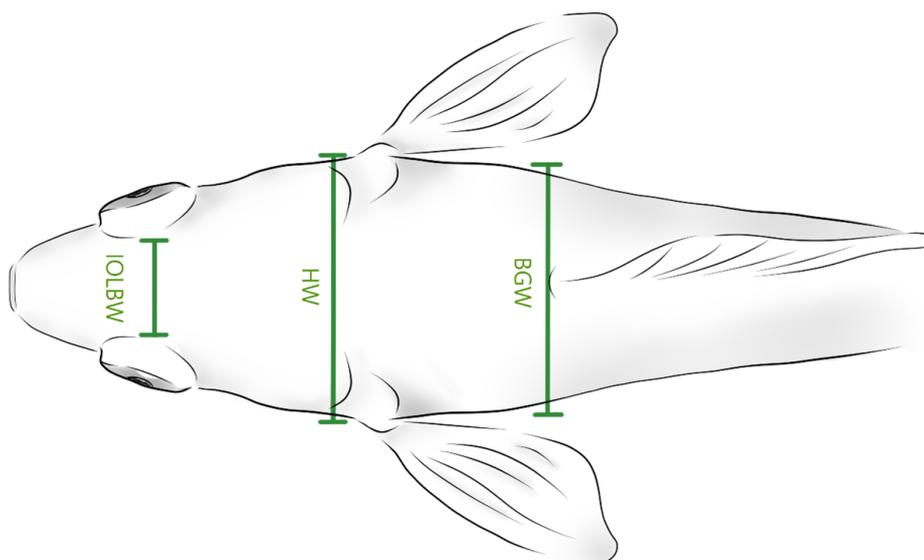


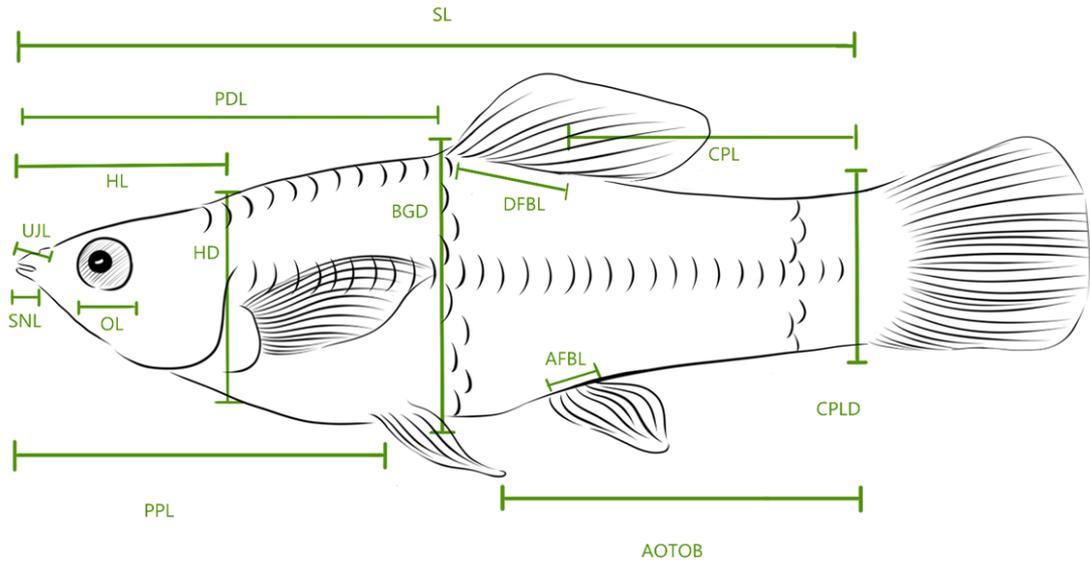
Figura 5. Ilustración sobre la toma de datos de anchura del cuerpo en *P. butleri* y *P. nelsoni*.

Las abreviaciones se explican en el cuadro 1 (ilustración por: Paola González).

Cuadro 1. Listado de caracteres morfométricos utilizados en el estudio.

NÚMERO	INGLÉS	ESPAÑOL	ABREVIATURA
1.	Standard Length	Longitud estándar	SL
2.	Head Length	Longitud de la cabeza	HL
3.	Predorsal Length	Longitud predorsal	PDL
4.	Prepelvic Length	Longitud prepélvica	PPL
5.	Anal Origen to Caudal Base	Origen anal a base caudal	AOTOB
6.	Body, Greatest Depth	Cuerpo, mayor profundidad	BGD
7.	Body Greatest Width	Cuerpo, mayor anchura	BGW
8.	Caudle Peduncle, Length	longitud del Pedúnculo caudal	CPL
9.	Caudle Penducle, Least Depth	Pedúnculo caudal, menor profundidad	CPLD
10.	Dorsal Fin, Basal Length	Aleta dorsal, longitud basal	DFBL
11.	Anal Fin, Basal Length	Aleta anal, longitud basal (Hembras)	AFBL
12.	Gonopodiun Length (Male)	Longitud del gonopodio (Machos)	GL
13.	Head Depth	Profundidad de la cabeza	HD
14.	Head Width	Anchura de la cabeza	HW
15.	Interorbital, Least Bony Width	Interorbital, Anchura ósea menor	IOLBW
16.	Orbit Length	Longitud de la órbita	OL
17.	Snouth Length	Longitud de la boca	SNL
18.	Upper Jaw Length	Longitud del maxilar superior	UJL

Poecilia nelsoni



Poecilia nelsoni

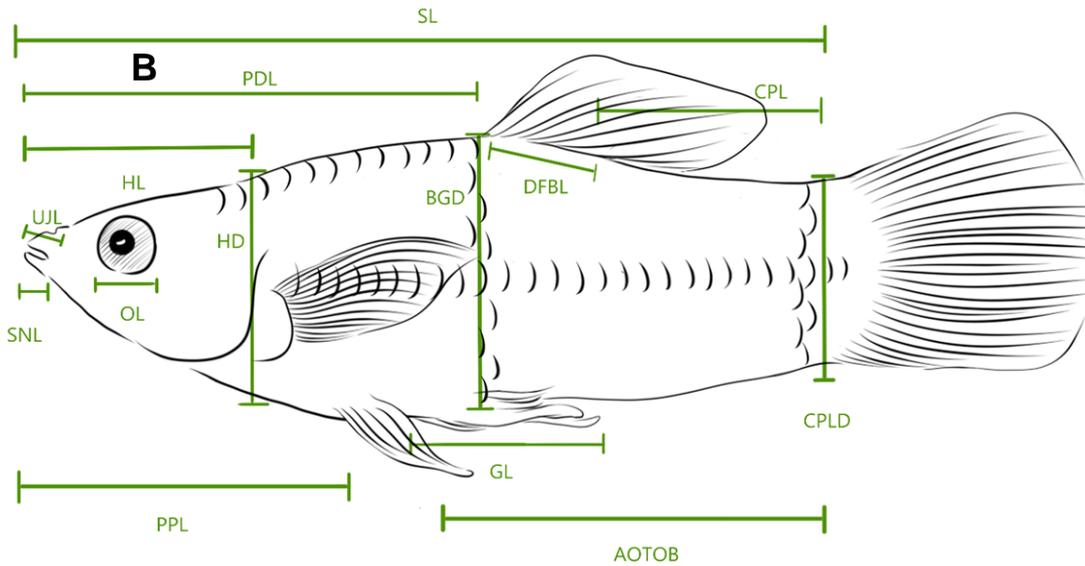
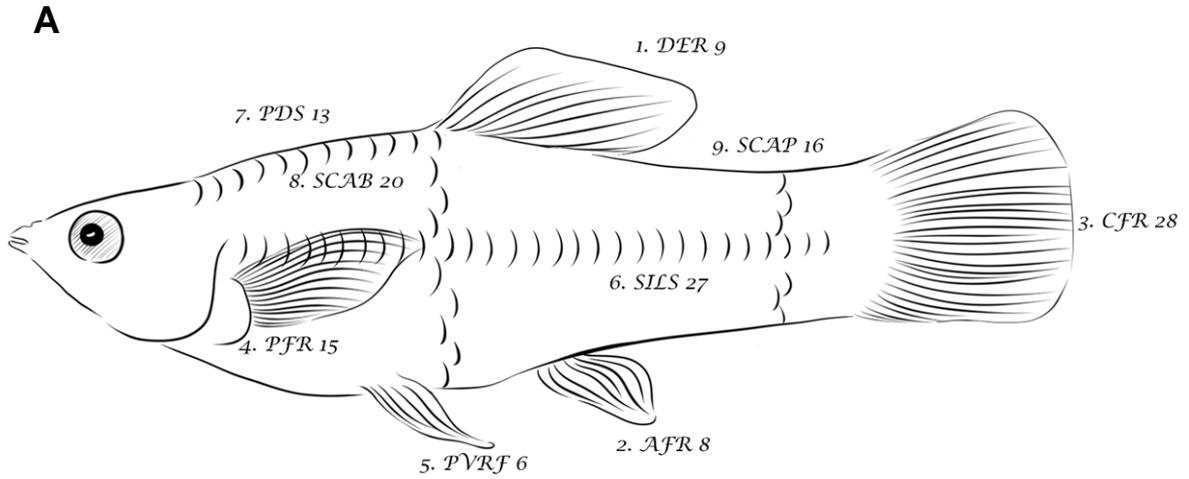


Figura 6. Ilustración sobre la toma de datos morfométricos para A) hembras B) machos en *P. butleri* y *P. nelsoni*, las abreviaciones se explican en el cuadro 1. (ilustración por: Paola González).

Cuadro 2. Listado de caracteres merísticos utilizados en el estudio.

NÚMERO	NOMBRE EN INGLÉS	NOMBRE EN ESPAÑOL	ABREVIATURA
1.	Dorsal Fin Rays	Rayos de la aleta dorsal	DFR
2.	Anal Fin Rays	Rayos de la aleta anal	AFR
3.	Caudal Fin Rays	Rayos de la aleta caudal	CFR
4.	Pectoral Fin Rays	Rayos de la aleta pectoral	PFR
5.	Pelvic Fin Rays	Rayos de la aleta pélvica	PVFR
6.	Scales in Lateral Series	Escamas en serie lateral	SILS
7.	Predorsal Scales	Escamas predorsales	PDS
8.	Scales Count Around the body	Número de escamas alrededor del cuerpo	SCAB
9.	Scales Count Around Peduncle	Número de escamas alrededor del pedúnculo	SCAP

Poecilia nelsoni



Poecilia nelsoni

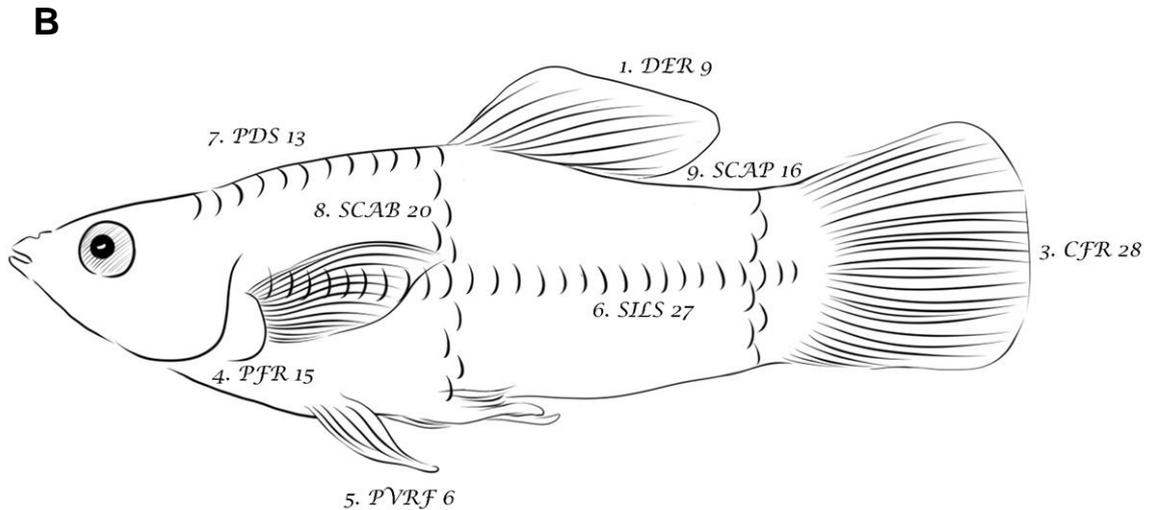


Figura 7. Ilustración sobre la toma de datos merísticos para A) hembras B) machos en *P. butleri* y *P. nelsoni*. Las abreviaciones se explican en el Cuadro 2 (ilustración por: Paola González).

Para la toma de medidas morfométricas se empleó un vernier electrónico con precisión de 0.01 mm, las cuales se estandarizaron en porcentaje con respecto a la longitud estándar y longitud de cabeza, con el propósito de reducir el factor alométrico causado por la diferencia en el tamaño de los ejemplares (Crisci y López-Armengol, 1983). Los caracteres correspondientes a medidas de la cabeza (HD, HW, IOLBW, OL, SNL y UJL) se estandarizaron respecto a la longitud de la cabeza (HL) y el resto de caracteres corporales (SL, HL, PDL, PPL, AOTOB, BGD, BGW, CPL, CPLD, DFBL, AFBL y GL) se estandarizaron respecto a la longitud estándar (SL).

Para visualizar el patrón de variación morfológica entre las especies y los caracteres que determinan los grupos dentro del espacio multivariado, se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) en el software R Studio (R Core Team, 2020) de machos y hembras basados en los datos de caracteres morfométricos y merísticos recopilados, (Sneath y Sokal, 1973).

6.1.2. Morfometría geométrica

La morfometría geométrica basada en puntos de referencia se utilizó para examinar la variación entre especies (Zelditch *et al.*, 2004; Cardini *et al.*, 2009). Se tomaron imágenes digitales (perfil lateral) de hembras y machos conservados en alcohol al 75% utilizando una cámara digital Nikon. Todas las imágenes se tomaron con el factor de escala en mm.

Sólo se consideraron peces de 1.5cm - 8 cm aproximadamente y se colocaron 17 puntos de referencia anatómicos (Figura 8 y 9) basados en Zúñiga-Vega *et al* (2011): 1) Punta del hocico; 2) Centro del del ojo; 3) Por encima del ojo en el perfil corporal; 4) Inserción anterior de la aleta dorsal; 5) Punto medio entre los puntos 3 y 4 del perfil corporal; 6) Inserción posterior de la aleta dorsal; 7) Inserción dorsal de la aleta caudal; 8) Punto medio entre los puntos 6 y 7 del perfil corporal; 9) Inserción ventral de la aleta caudal caudal; 10) Base de la aleta caudal a la altura de la línea lateral; 11) Inserción posterior de la aleta anal/ gonopodio ; 12) Punto medio entre los puntos de referencia 9 y 11 en el perfil del cuerpo; 13) Inserción anterior de la aleta anal/ gonopodio; 14) Apertura del opérculo 14; 15) Punto medio entre los puntos 13 y 14 del perfil corporal; 16) Inserción superior de la aleta superior de la aleta pectoral; 17) Inserción inferior de la aleta pectoral. Después de marcar cada punto anatómico con alfileres, se capturó en fotografías el perfil lateral de cada espécimen y se

colocaron digitalmente los puntos anatómicos en el software TPSDIG 64 (Rohlf, 2015).

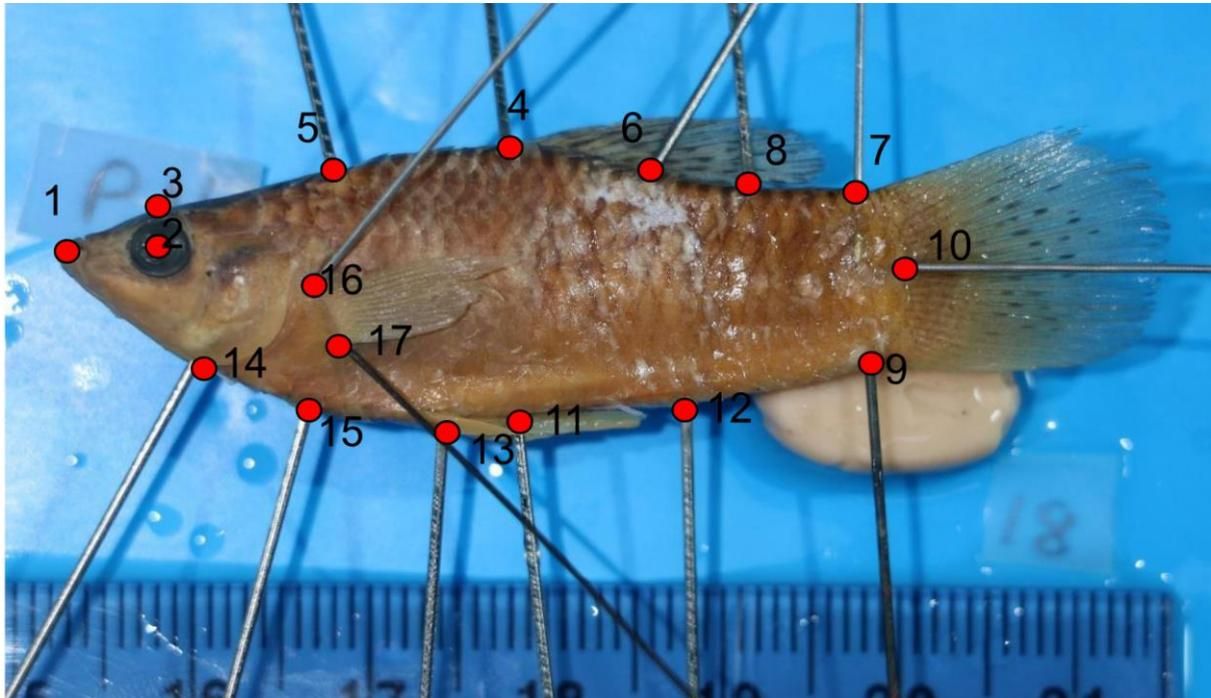


Figura 8. Localización de los 17 puntos de referencia anatómicos en machos.

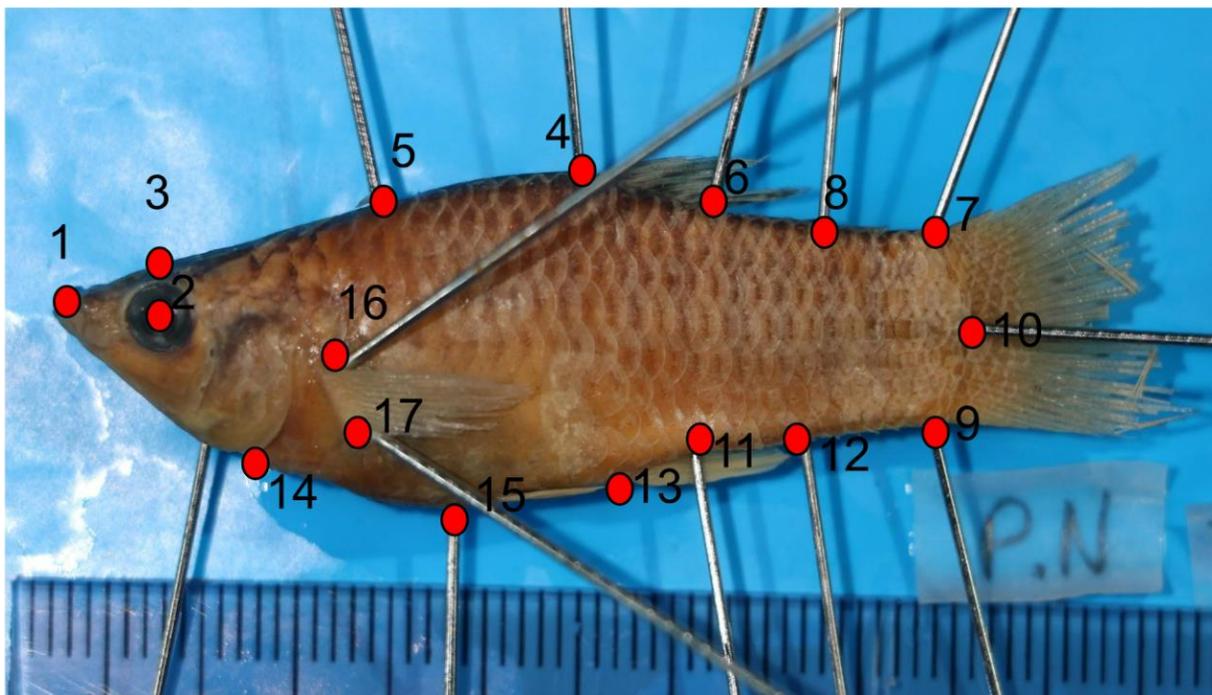


Figura 9. Localización de los 17 puntos de referencia anatómicos en hembras.

A partir de estos puntos anatómicos de referencia digitalizados se realizaron Análisis de Variables Canónicas (CVA) en el software MorphoJ (Klingenberg, 2011). Lo anterior con la finalidad de analizar la varianza en los puntos anatómicos de los especímenes en espacio multivariado e identificar diferencias significativas.

6.2. ANÁLISIS MOLECULARES

Para discernir las diferencias genéticas entre *P. butleri* y *P. nelsoni* se realizó una búsqueda de secuencias del gen codificante mitocondrial del Citocromo B (Cytb), en Genbank (Benson *et al.*, 2015), con los términos *Poecilia butleri* y *Poecilia nelsoni*. Las secuencias fueron cuidadosamente seleccionadas, ya que debían contar con las coordenadas del sitio de colecta o nombre del lugar de colecta que permitiera la inferencia de las coordenadas. Además, se obtuvo una secuencia del pez *Belonesox belizanus* para utilizarla como grupo externo en la filogenia y enraizar los árboles a construir.

Siguiendo el estudio de Palacios *et al.*, (2016), las secuencias se clasificaron de acuerdo con su procedencia, al norte del ENTM se identificaron como *P. butleri* y al sur como *P. nelsoni*. Las secuencias seleccionadas fueron alineadas con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en el software MEGA X v10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018). El alineamiento de las secuencias fue inspeccionado visualmente y recortado al tamaño equivalente de 1086 pares de bases.

Utilizando las secuencias alineadas y con el fin de conocer las relaciones filogenéticas entre los especímenes de *P. butleri* y *P. nelsoni*, se realizó un análisis filogenético bajo inferencia bayesiana utilizando el programa Mr. Bayes v3.2.7 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Para la inferencia bayesiana se utilizó una simulación a través de 5 000 000 generaciones con 4 cadenas de Markov de Monte Carlo y muestreando cada 1 000 generaciones, basadas en el modelo de sustitución nucleotídica GRT+I+Gama. Se verificó que el análisis llegara a 0.01 de desviación estándar promedio de frecuencias divididas y finalmente, el árbol generado fue visualizado en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010).

Para la visualizar las relaciones dentro y entre las secuencias de las poblaciones de ambas especies se realizó una red de haplotipos basada en el método

del Minimum Spanning Network (Bandelt *et al.*, 1999) que realiza redes que se conectan a través de nodos que representan secuencias de entrada conectadas por aristas, sin ciclos, con la longitud total más corta posible (donde las longitudes de las aristas son iguales a las distancias entre pares de secuencias) (Leigh *et al.*, 2015). Se utilizó el alineamiento previamente generado y el software PopArt (Population Analysis with Reticulate Trees) (Leigh *et al.*, 2015).

VII. RESULTADOS

7.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

7.1.1. Morfometría lineal

Se analizaron un total de 179 ejemplares de peces, 80 ejemplares correspondientes a la especie *P. butleri* y 99 a *P. nelsoni*, de 22 lotes pertenecientes a la colección de peces del Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal (ECO-SC-P), con los siguientes números de registro 8 103, 8 335, 8 242, 9 864, 8 021, 13 123, 8 037, 8 015, 7 926, 7 894, 8 044 (Nayarit), 7 131, 4 627, 4 550, 5 916, 5 032, 6 379 (Chiapas), 7 130 (Guerrero), 7 126, 7 129, 7 354 y 7 355 (Oaxaca). La localización relativa de los lotes puede verse en la Figura 10.

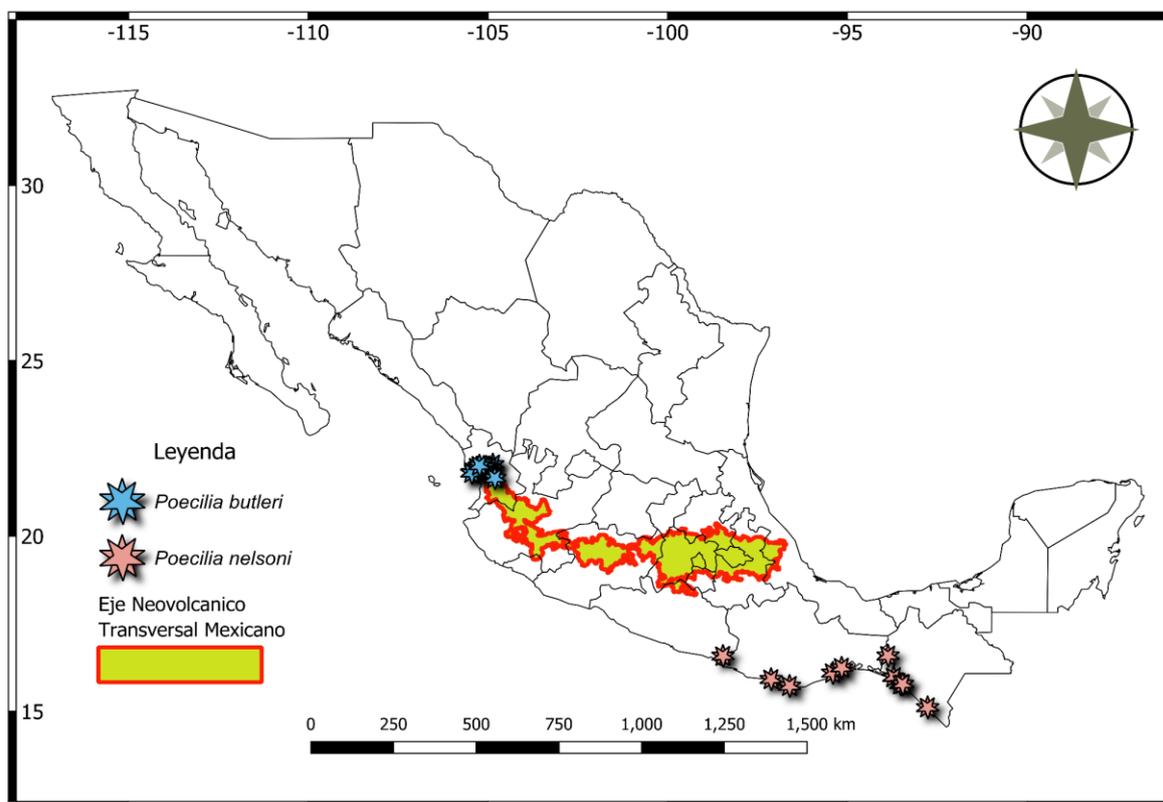


Figura 10. Mapa de distribución de los puntos de colecta de los lotes de *P. butleri* y *P. nelsoni*.

Se encontró que *P. butleri* presenta una media de longitud estándar de 39.48 mm (± 10.29 DS; (Cuadro 3), mientras que, *P. nelsoni* presenta una longitud estándar de 39.76 mm (± 12.96 DS) (Cuadro 3). Los estadísticos de los caracteres merísticos (Cuadro 4 y 5) así como de los morfométricos (Cuadro 6 y 7) mostraron cierta

variabilidad entre hembras y machos de la misma especie que son normales dentro del dimorfismo sexual del género; sin embargo, por sí solos no enmarcan alguna diferencia notoria entre las dos especies.

Cuadro 3. Variabilidad de la longitud estándar en *P. butleri* y *P. nelsoni*.

	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍNIMO	MÁXIMO
<i>P. butleri</i>	81	39.48 mm	10.29	22.75 mm	62.09 mm
<i>P. nelsoni</i>	99	39.77 mm	12.10	17.48 mm	59.7 mm

Cuadro 4. Estadísticos descriptivos de los caracteres merísticos en hembras y machos de *P. butleri*.

	H (64)				M (17)			
	MODA	DESVIACIÓN	MÍN.	MÁX.	MODA	DESVIACIÓN	MÍN.	MÁX.
1.DFR	9.00	0.43	8.00	10.0	9.0	0.49	8.0	10.0
2.AFR	8.00	0.00	8.00	8.00	NA	NA	NA	NA
3.CFR	29.0	1.05	26.0	32.0	29.0	1.05	27.0	31.0
4. PFR	15.0	0.39	14.00	16.00	15.00	0.43	14.0	16.0
5.PVRF	6.0	0.00	6.00	6.00	6.00	0.00	6.00	6.0
6. SILS	27.0	1.24	22.0	28.0	27.0	0.87	22.0	28.0
7. PDS	13.0	0.81	9.0	14.0	13.0	0.87	10.0	13.0
8. SCAB	22.0	1.31	19.00	25.00	20.00	1.75	19.00	24.00
9. SCAP	18.0	0.83	15.00	20.00	18.00	0.86	16.00	19.00

Cuadro 5. Estadísticos descriptivos de los caracteres merísticos en hembras y machos de *P. nelsoni*.

	H (66)				M (33)			
	MODA	DESVIACIÓN	MÍN.	MÁX.	MODA	DESVIACIÓN	MÍN.	MÁX.
1. DFR	9.00	0.46	8.00	10.00	9.00	0.50	8.00	10.00
2. AFR	8.00	0.12	7.00	8.00	NA	NA	NA	NA
3. CFR	28.00	1.22	24.00	30.00	28.00	0.83	27.00	30.00
4. PFR	15.00	0.50	14.00	16.00	15.00	0.56	14.00	16.00
5. PVRF	6.00	0.00	6.00	6.00	6.00	0.00	25.00	6.00
6. SILS	27.00	0.86	24.00	29.00	27.00	0.92	24.00	28.00
7. PDS	13.00	0.60	12.00	14.00	13.00	0.53	12.00	14.00
8. SCAB	20.00	1.33	19.00	24.00	19.00	0.87	18.00	22.00
9. SCAP	16.00	0.70	15.00	18.00	16.00	0.43	15.00	17.00

Cuadro 6. Estadísticos descriptivos de los caracteres morfométricos en hembras y machos de *P. butleri*.

	H (64)				M (17)			
	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍN'	MÁX.	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍN.	MÁX.
1.HL%	29.4	1.8	24.1	33.3	29.1	2.2	23.4	32.3
2.PDL%	59.2	4.1	30.4	64.9	57.4	2.8	50.3	61.0
3.PPL%	47.3	2.2	42.1	53.0	42.9	2.8	38.3	46.9
4.AOTOB%	43.7	3.1	37.0	59.6	52.8	3.3	47.2	59.2
5.BGD%	31.6	2.0	25.1	39.7	32.6	3.7	22.8	40.0
6.BGW%	15.3	2.0	9.0	21.3	14.2	3.2	2.9	18.3
7.CPL%	31.8	3.0	18.4	40.3	44.9	3.7	39.8	53.4
8.CPLD%	20.8	1.5	17.0	25.2	23.2	1.8	19.9	26.9
9.DFBL%	12.7	1.2	10.0	15.1	14.9	1.2	13.4	17.1
10.AFBL%	6.8	0.9	4.4	8.6	NA	NA	NA	NA
11.GL%	NA	NA	NA	NA	24.8	2.8	20.2	29.1
12.HD%	84.7	10.3	29.2	105.6	88.3	5.9	81.4	102.7
13.HW%	62.0	5.7	47.8	80.9	59.2	5.3	47.0	67.5
14.IOLBW%	50.0	2.8	43.9	57.8	47.6	3.2	42.8	53.0
15.OL%	28.2	2.2	22.8	32.9	28.9	2.3	26.4	34.1
16.SNL%	10.8	2.2	7.0	17.7	11.0	1.4	9.0	14.0
17.UJL%	7.7	1.6	3.6	11.1	7.7	1.7	4.2	10.0

Cuadro 7. Estadísticos descriptivos de los caracteres morfométricos en hembras y machos de *P. nelsoni*.

	H (66)				M (33)			
	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍN.	MÁX.	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍN.	MÁX.
1.HL%	30.1	2.8	22.7	35.3	29.1	1.4	26.8	34.5
2.PDL%	60.3	2.5	46.7	64.6	56.9	2.7	51.3	63.6
3.PPL%	48.1	3.5	28.8	59.7	41.2	1.3	37.3	47.1
4.AOTOB%	43.6	3.3	35.2	52.0	56.0	2.6	43.5	64.1
5.BGD%	32.7	3.6	18.6	40.6	33.9	2.0	28.8	50.0
6.BGW%	16.5	3.3	9.4	22.7	16.0	1.8	10.6	20.2
7.CPL%	31.8	2.4	26.9	41.6	48.7	4.3	40.5	54.5
8.CPLD%	20.2	1.5	16.7	23.1	23.8	0.5	18.3	27.4
9.DFBL%	12.8	2.0	16.7	16.0	15.0	1.2	10.2	17.7
10.AFBL%	7.1	0.9	4.1	8.9	NA	NA	NA	NA
11.GL%	NA	NA	NA	NA	24.0	0.0	21.0	30.8
12.HD%	84.9	8.6	70.9	110.4	88.8	3.6	69.5	99.4
13.HW%	63.5	10.6	45.2	87.8	60.8	7.9	47.1	76.7
14.IOLBW%	48.0	4.5	39.4	66.6	45.8	3.9	38.7	61.8
15.OL%	27.1	2.4	22.2	37.5	27.6	1.6	23.2	33.4
16.SNL%	10.4	1.9	6.7	16.3	10.6	1.3	8.0	15.2
17.UJL%	7.9	1.8	4.4	15.6	7.0	1.9	5.0	14.7

7.1.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El Análisis de Componentes Principales de los caracteres morfométricos entre machos de *P. butleri* y *P. nelsoni* (Figura 11), muestra que el 43.55% de la variabilidad está concentrada en PC1, representado principalmente por la variable porcentaje de profundidad de cabeza (HD%), el PC2 por otro lado representa el 14.68% de la varianza y la variable porcentaje del origen anal a base caudal (AOTOB%) presenta mayor correlación con el eje. Las elipses con un intervalo de confianza del 95% muestran un área de traslape considerable en el espacio multivariado entre ambas especies, ya que los individuos de cada especie se distribuyen casi de forma aleatoria en el espacio multivariado, por lo que no se aprecian diferencias entre ambas especies para este análisis.

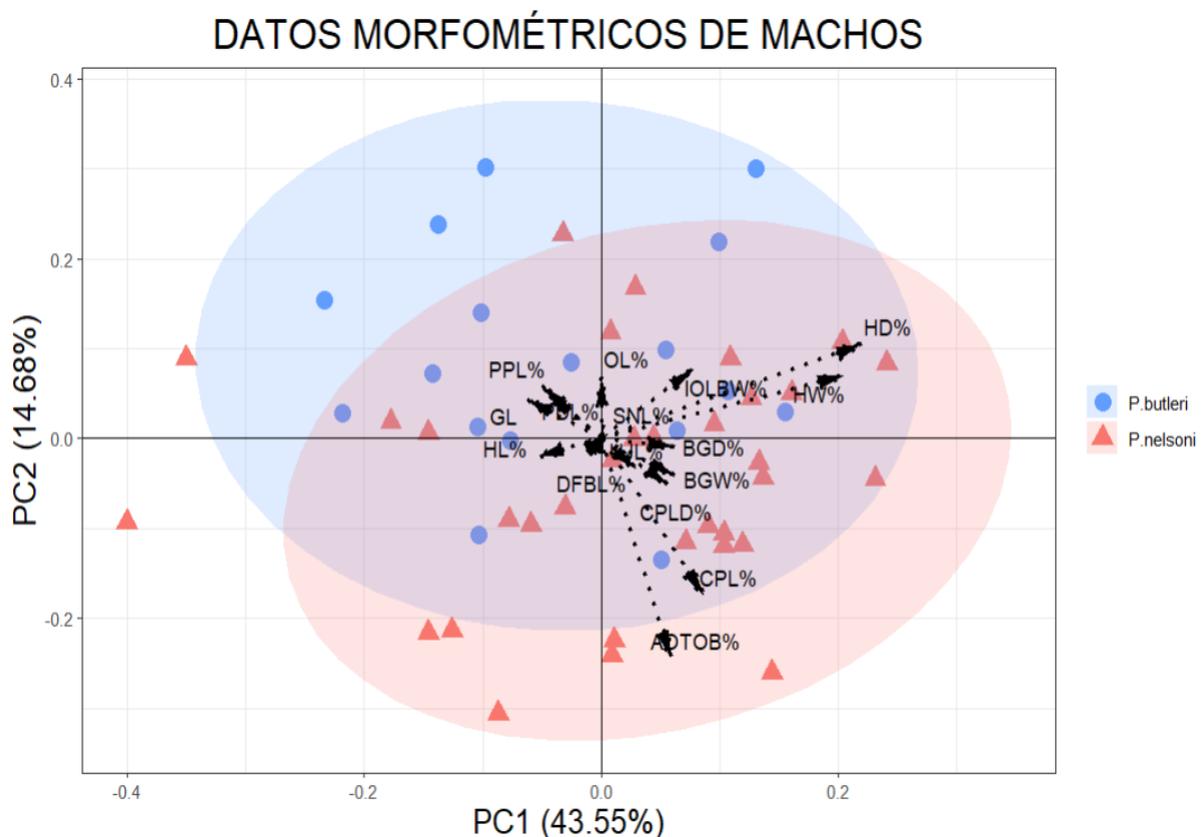


Figura 11. Análisis de componentes principales entre machos de *P. butleri* y *P. nelsoni* a partir de los datos morfométricos estandarizados obtenidos.

Para el PCA de los caracteres morfométricos entre hembras de *P. butleri* y *P. nelsoni* (Figura 12) se muestra que 57.38% de la variabilidad está concentrada en PC1, y PC2 representa el 11.13% de la varianza. La variable porcentaje de profundidad de cabeza (HD%) y porcentaje de anchura de cabeza (HW%) representan para ambos ejes ser las variables más correlacionadas; las elipses con un intervalo de confianza del 95% muestran un área de traslape muy alto en el espacio multivariado entre ambas especies, por lo que tampoco se aprecian diferencias entre ambas especies para este análisis.

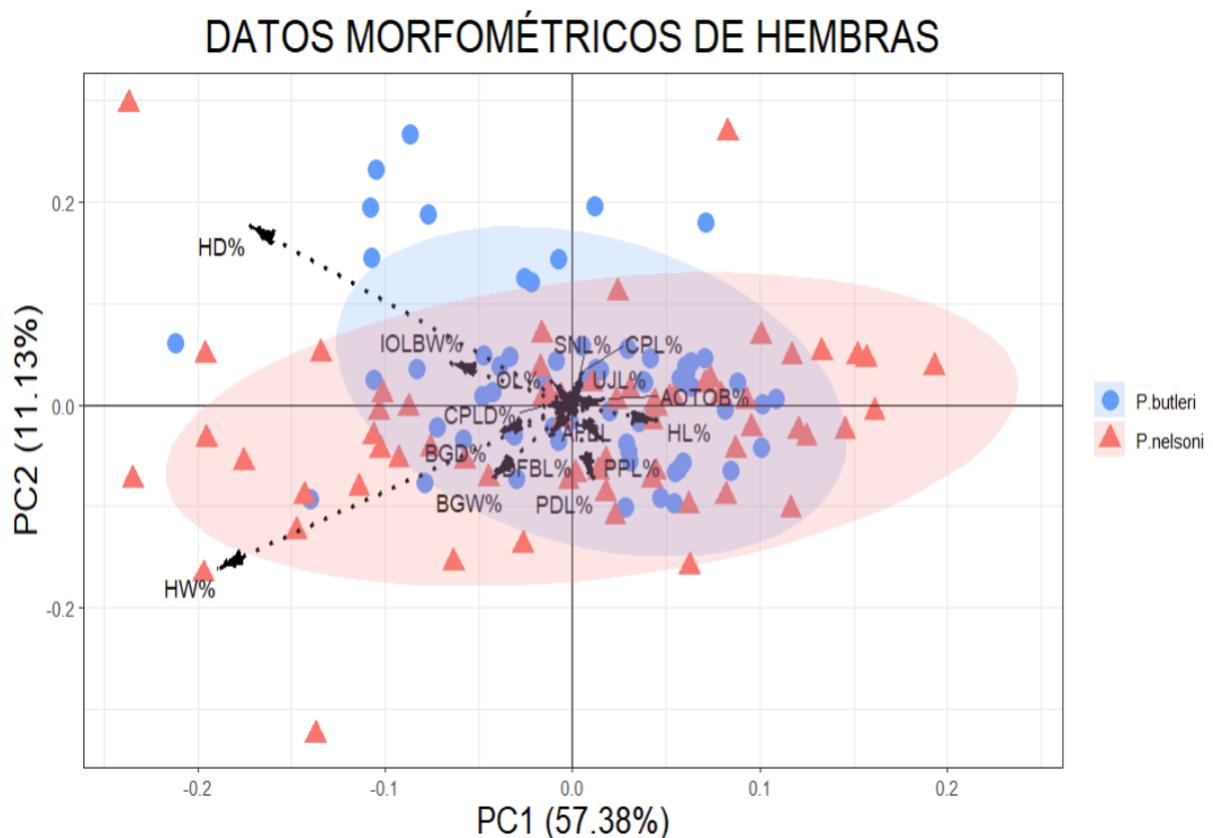


Figura 12. Análisis de componentes principales entre hembras de *P. butleri* y *P. nelsoni* a partir de los datos morfométricos estandarizados obtenidos.

El PCA de los caracteres merísticos entre machos de *P. butleri* y *P. nelsoni* (Figura 13) muestra que el 42.93% de la varianza está concentrada en PC1, correlacionada principalmente por la variable número de escamas alrededor del cuerpo (SCAB) y escamas en serie lateral (SILS). Este eje también está ligeramente representado por las variables número de escamas alrededor del pedúnculo (SCAP) y rayos de aleta caudal (CFR). Por otro lado, el PC2 representa el 27.81% de la varianza y la variable escamas en serie lateral (SILS) presenta mayor correlación con el eje; las elipses con un intervalo de confianza del 95% muestran un área de traslape considerable en el espacio multivariado entre ambas especies. Se puede observar que los individuos de *P. nelsoni* se conglomeran dentro del elipse con mayor área de *P. butleri*, por lo que no se aprecian diferencias entre ambas especies, pero se hace notoria la correlación intraespecífica.

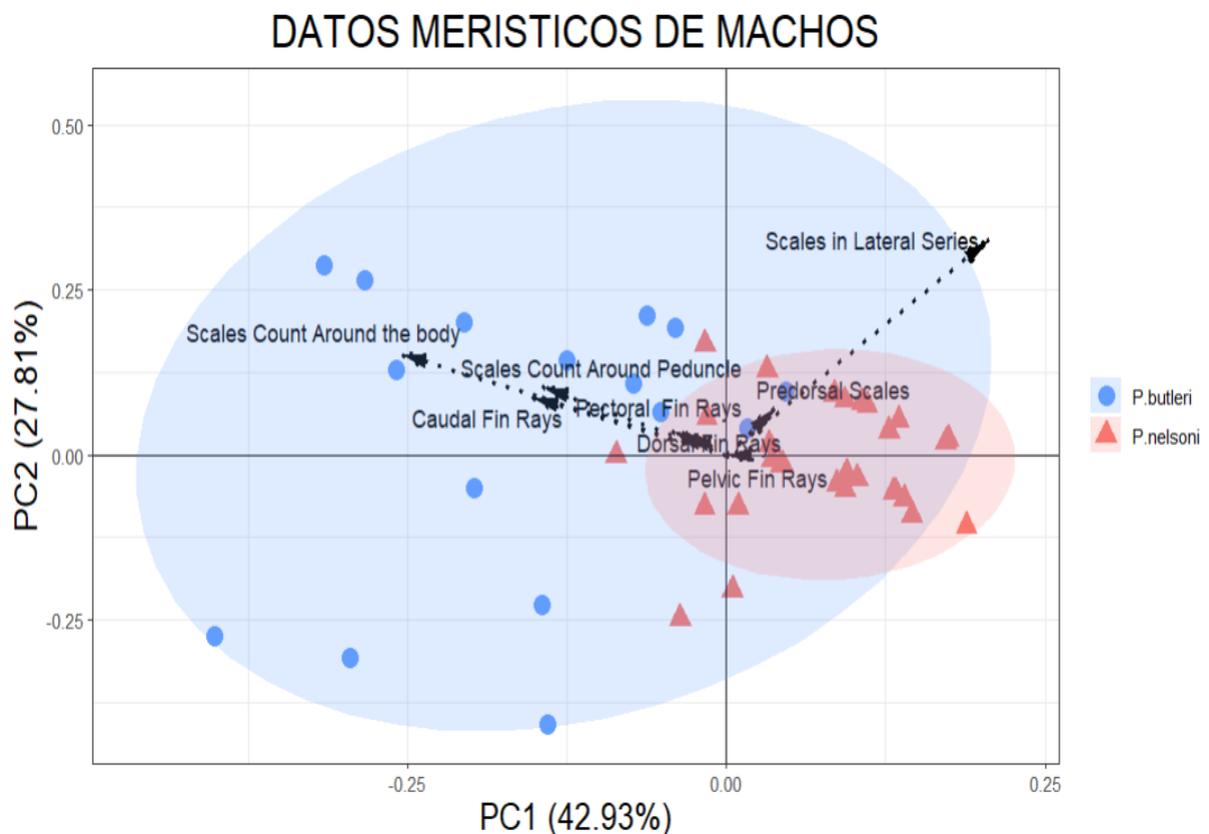


Figura 13. Análisis de componentes principales entre machos de *P. butleri* y *P. nelsoni* a partir de los datos merísticos obtenidos.

En el PCA de los caracteres merísticos entre hembras de *P. butleri* y *P. nelsoni* (Figura 14) se muestra que 37.06% de la variabilidad está concentrada en PC1 y mientras que el eje PC2 representa el 26.04% de la varianza. Para ambas especies las variable número de escamas alrededor del cuerpo (SCAB) y rayos de aleta caudal (CFR) son las variables más correlacionadas para ambos ejes, la variable de escamas alrededor del pedúnculo (SCAP) es la segunda más importante para el eje PC1 y la variable de la escamas en serie lateral (SILS) es la segunda más importante para el eje PC2; los elipses intraespecíficos con un intervalo de confianza del 95% muestran un área de traslape en el espacio multivariado entre ambas especies, por lo que no existe una delimitación evidente entre ambas especies.

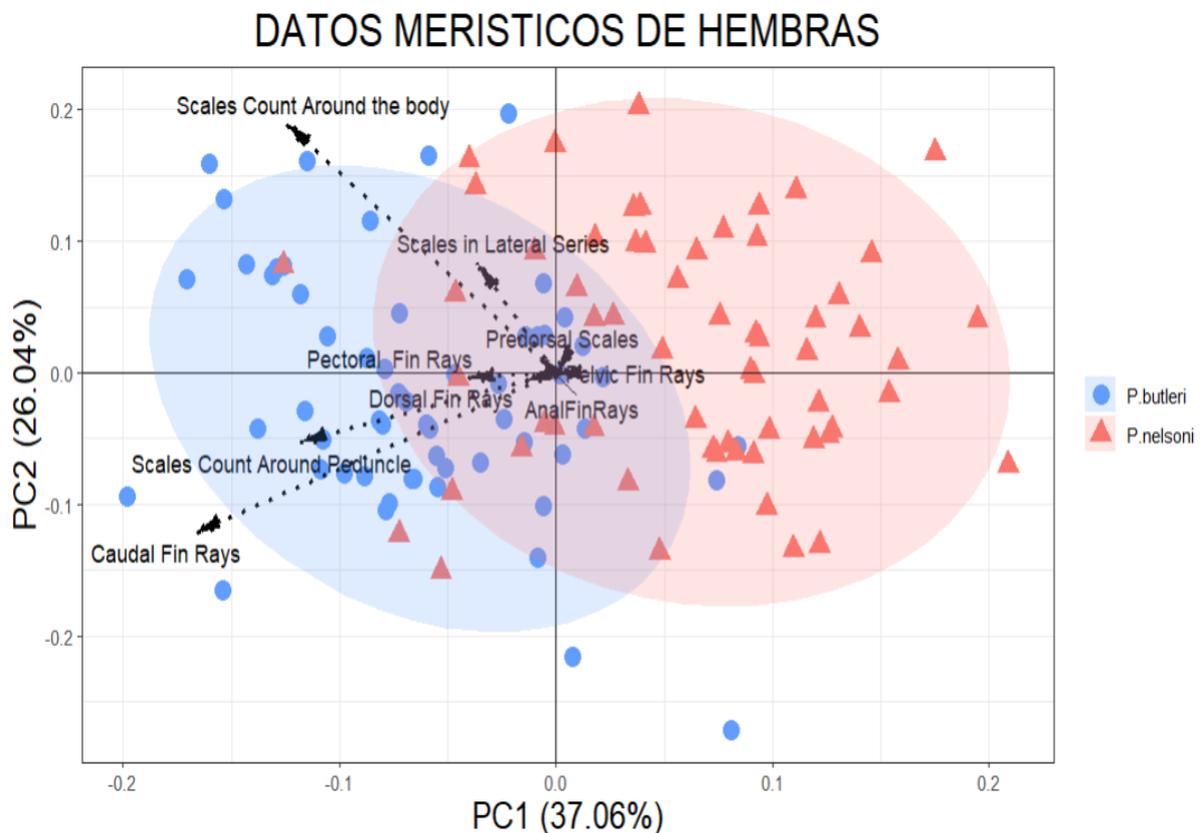


Figura 14. Análisis de componentes principales entre hembras de *P. butleri* y *P. nelsoni* a partir de los datos merísticos.

7.1.2. Morfometría geométrica

El diagrama del CVA de los datos de morfometría geométrica entre machos de *P. butleri* y *P. nelsoni*, mostró una clara distinción entre ambas especies colocando a las muestras de *P. butleri* de -7 a -9 y a *P. nelsoni* de 2 a 8 sobre las coordenadas del CVA1 (Figura 15), lo que discrimina totalmente a una especie de otra. Los gráficos de alambres que son el grupo de líneas que conectan a los puntos anatómicos para ayudar a visualizar la forma del cuerpo que se incluyen dentro de la Figura 15 muestran que *P. butleri* tiende a tener ubicados los ojos cerca de la boca, aletas pectorales más cerca de la cabeza y aleta caudal con mayor inclinación a hacia la parte anterior del cuerpo, en cambio *P. nelsoni* tiende a tener estos rasgos más orientados hacia el lado posterior del cuerpo además de presentar un cuerpo con mayor profundidad.

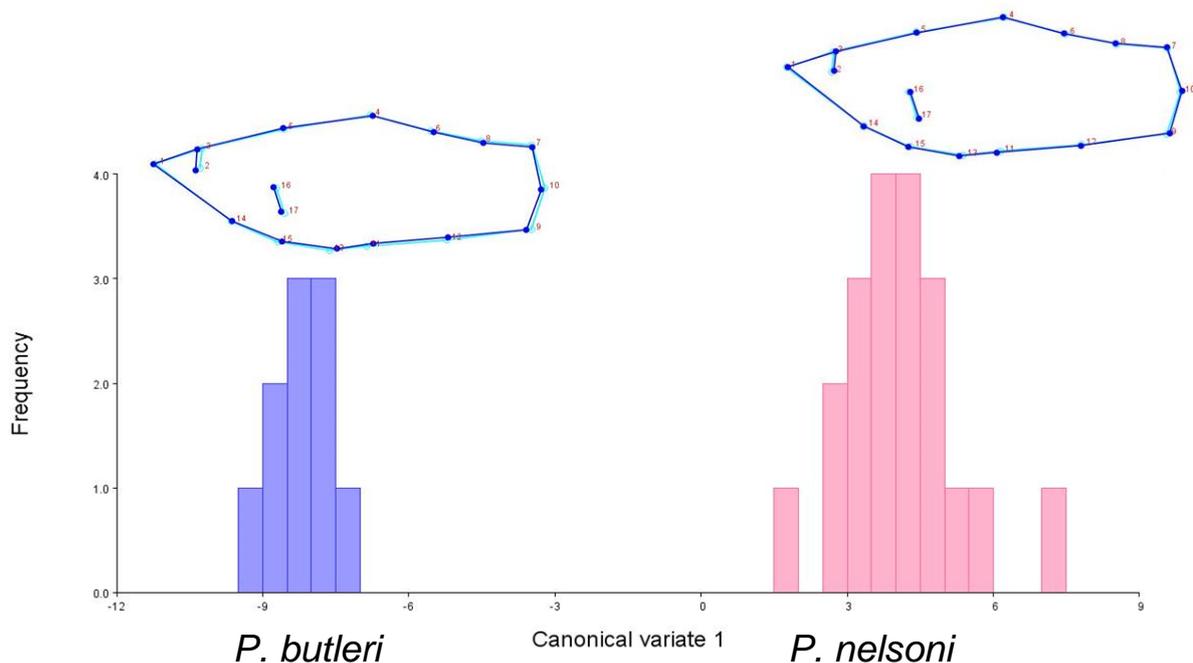


Figura 15. Análisis de Variables Canónicas entre machos de *P. butleri* y *P. nelsoni* a partir de los datos de morfometría geométrica.

El diagrama del CVA de los datos de morfometría geométrica entre hembras de *P. butleri* y *P. nelsoni* muestra poca variabilidad, colocando a *P. nelsoni* desde -4 a 1.6 y a *P. butleri* de -1 a 3.2 sobre las coordenadas del CVA 1 (Figura 16). Se observa un traslape desde -1 hasta 1.6, en los gráficos de alambres dentro de la Figura 16 se observa que *P. nelsoni* tiene la punta del hocico con un ángulo más inclinado hacia arriba y en cambio *P. butleri* lo tiene más inclinado hacia abajo además que al igual que los machos las hembras de *P. nelsoni* presentan un cuerpo con mayor profundidad.

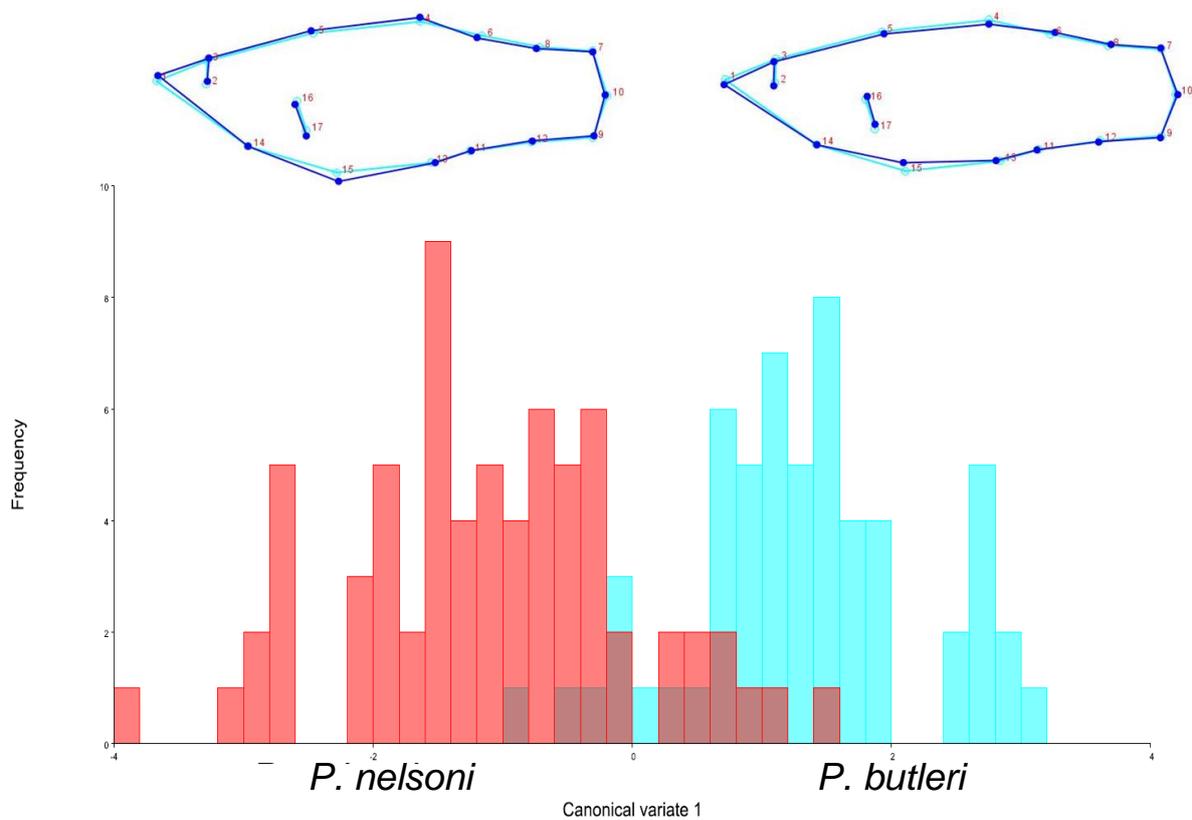


Figura 16. Análisis de Variables Canónicas entre hembras de *P. butleri* y *P. nelsoni* a partir de los datos de morfometría geométrica.

7.2. ANÁLISIS MOLECULARES

Se consiguió la localización de las 66 secuencias del Cytb de GenBank (Figura 17), obteniendo finalmente 34 secuencias para la especie *P. butleri*, 32 para *P. nelsoni* siguiendo la clasificación taxonómica basada en el estudio de Palacios *et al.*, (2016) y una secuencia para *Belonesox belizanus* como grupo externo.

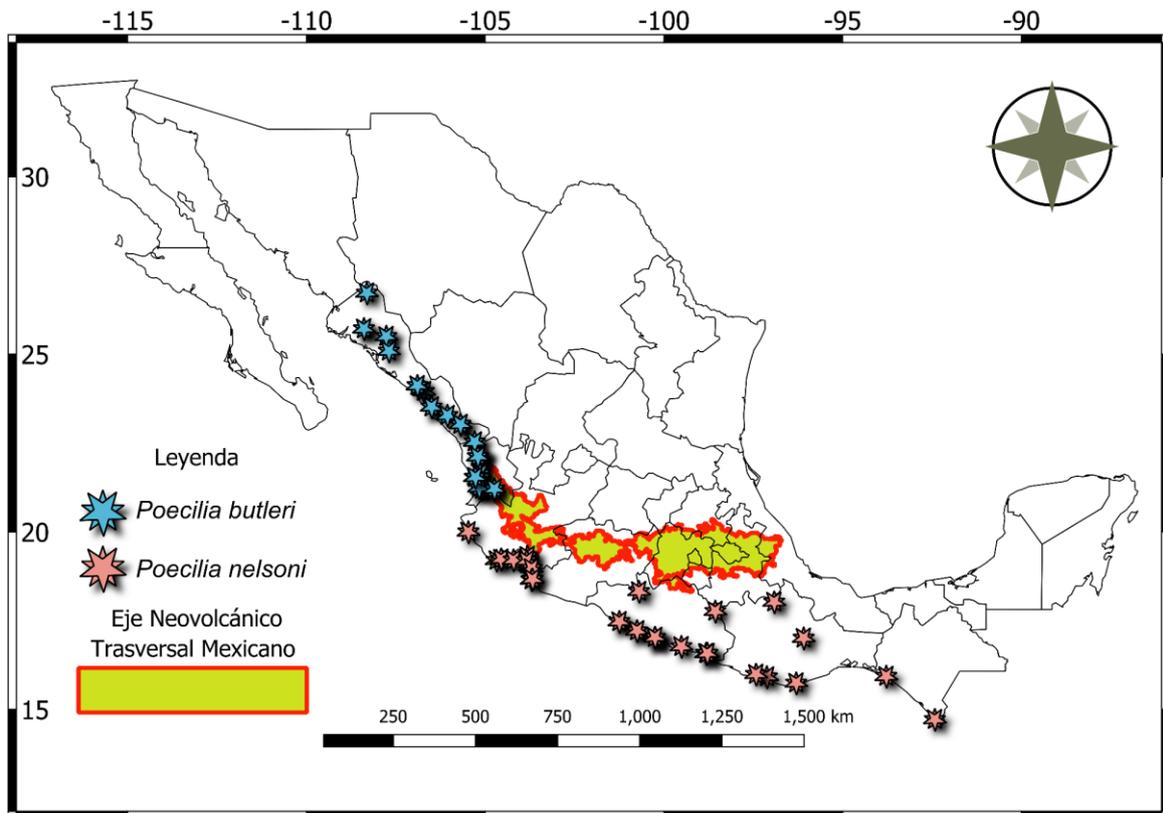


Figura 17. Mapa de distribución de los puntos de colecta de las secuencias del Cytb de *P. butleri* y *P. nelsoni*.

7.2.1. Red de haplotipos

La red de haplotipos generada con el método de *Minimum Spanning Network* (Figura 18) muestra mayor distancia genética (mayor número de mutación) entre las secuencias de las muestras al sur del ENTM en comparación de las muestras al norte del ENTM, además no existen haplotipos compartidos entre ejemplares del norte y sur del ENTM, lo que enmarca una clara distinción de especies existentes dentro de nuestra muestra, sin evidencia de flujo génico entre las poblaciones al norte y sur del ENTM, infiriendo que *P. butleri* se encuentra restringido al norte del ENTM y *P. nelsoni* al sur.

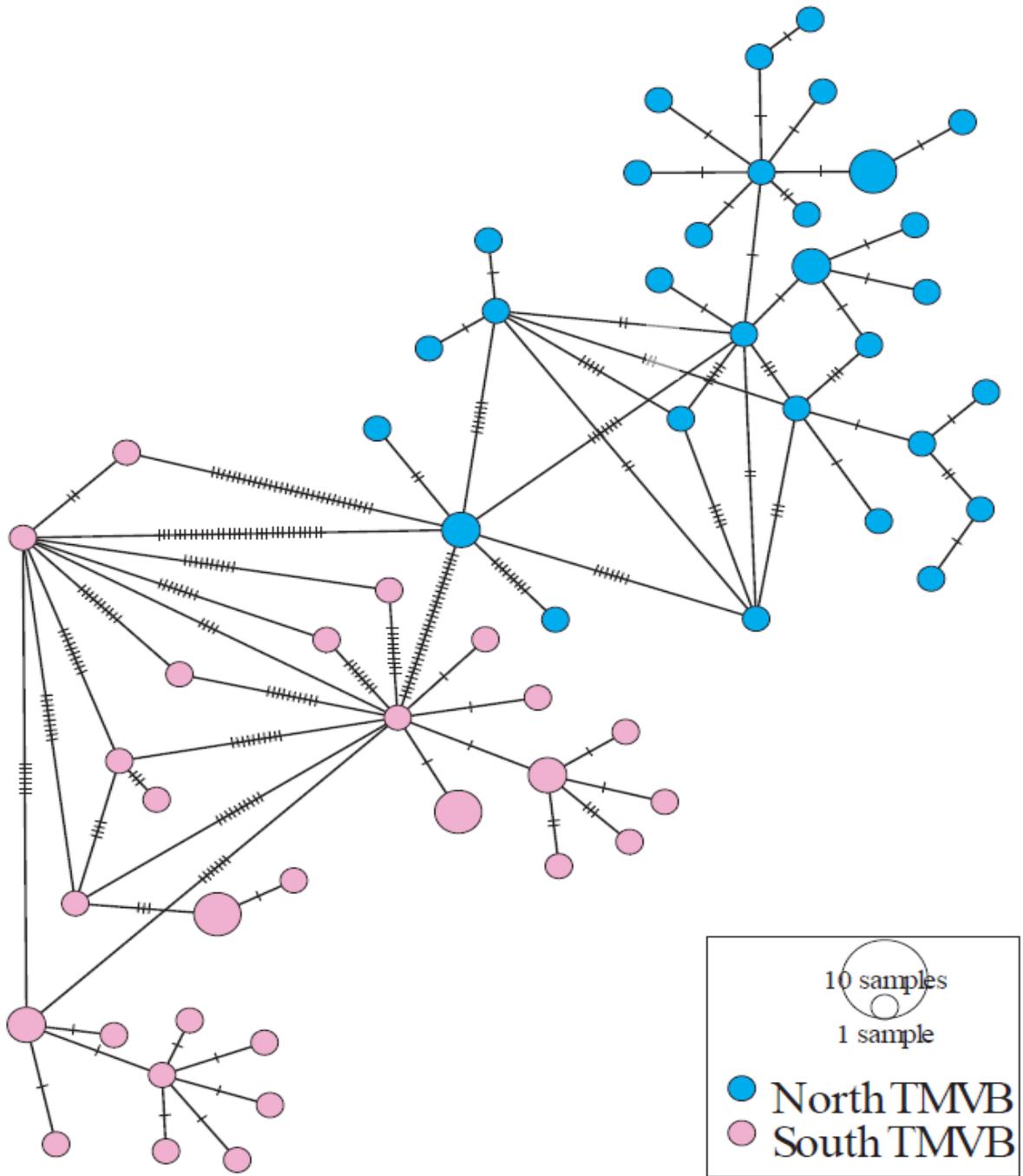


Figura 18. Red de haplotipos del *Cytb*, los nodos de secuencia correspondientes a *P. butleri* están en celeste y las secuencias de *P. nelsoni* en rosa.

7.2.2. Inferencia filogenética

El árbol filogenético inferido presenta probabilidades posteriores altas en la mayoría de los nodos, se observan dos clados bien definidos (Figura 19), el primero agrupa a las muestras que se encuentran al norte del ENTM en los estados de Nayarit y Sinaloa y el segundo agrupa a las muestras que se encuentran al sur del ENTM en Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas lo que concuerda completamente con la clasificación taxonómica basada en el estudio de Palacios *et al.*, (2016) que se ha manejado en este estudio para separar a *P. nelsoni* de *P. butleri*.

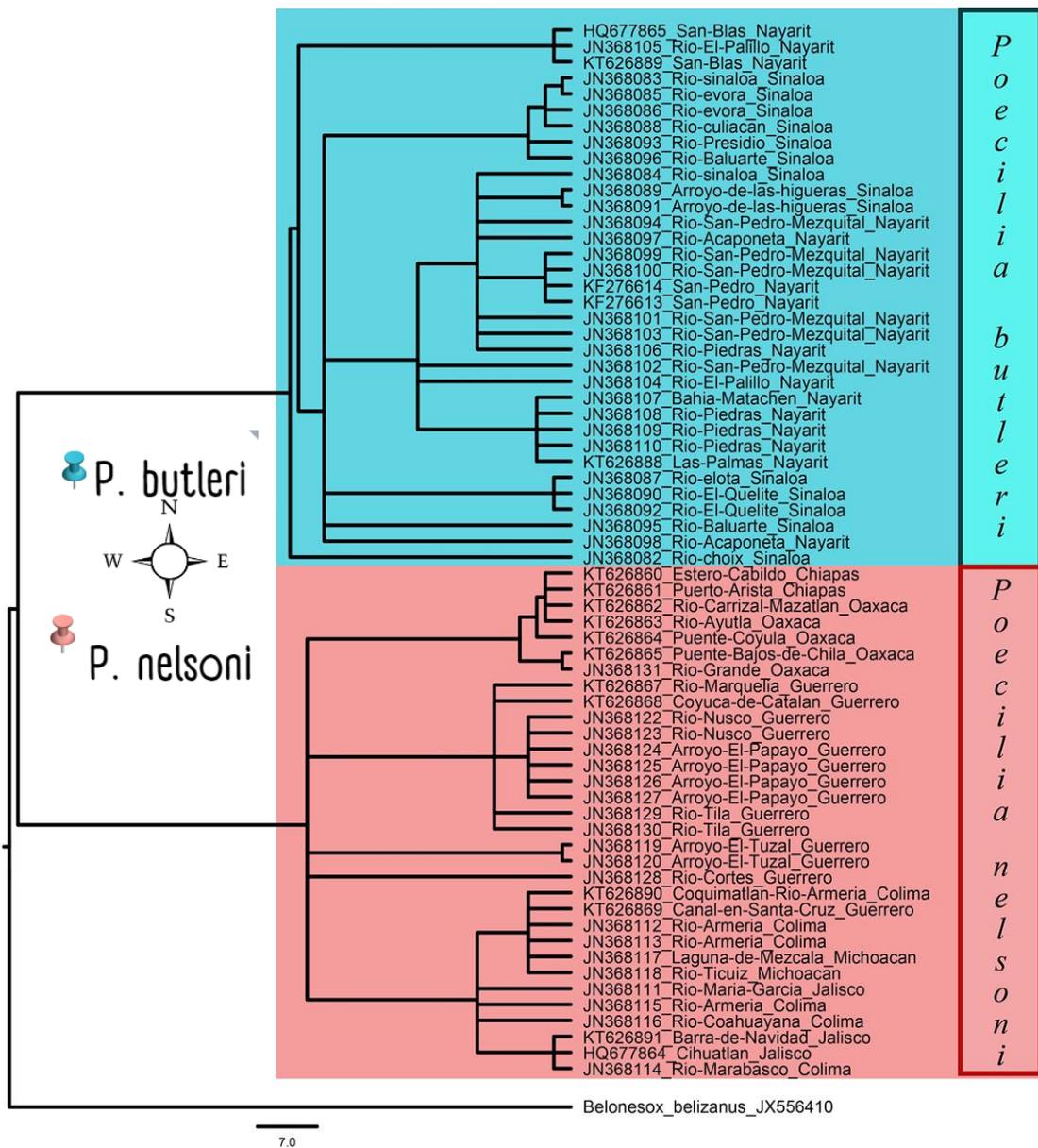


Figura 19. Análisis filogenético bajo inferencia bayesiana realizado con las secuencias del Cytb de *Belonesox belizanus*, *P. butleri* y *P. nelsoni* obtenidas de GenBank.

VIII. DISCUSIÓN

Tradicionalmente la delimitación y descripción de especies había estado restringido a un enfoque morfológico, lo que ocasionó problemas a largo plazo, pues se conoce que este enfoque sólo delimita a las llamadas 'morfoespecies' y no a la diversidad de la vida, dicha afirmación no significa que no puedan o no sean especies válidas, sino que además de su diversidad morfológica pueden existir diversos caracteres y enfoques con los que pueden comprobarse o definirse especies (Dayrat, 2005).

La introducción de métodos moleculares para la delimitación, identificación y descripción de especies ha ayudado a reconocer nuestra diversidad (Schoelinck y Puillandre, 2014); sin embargo, considerar que los métodos moleculares son el reemplazo a la taxonomía clásica para nombrar nuevas especies y estudiar sus relaciones sería incorrecto, incluso destructivo para todo lo que se ha construido y todo lo que puede seguir aportando la taxonomía clásica (Will *et al*, 2005).

Manejar la taxonomía desde una perspectiva integradora propone comunicación entre la diversidad de disciplinas (filogeografía, morfología comparada, genética de poblaciones, distribución, ecología, desarrollo, comportamiento, etc.), obteniendo así múltiples perspectivas que al complementarse llegan a delimitar de forma más completa a las especies, disminuyendo considerablemente la sobreabundancia de sinónimos en donde no deberían existir (Dayrat, 2005).

Al aplicar este enfoque integrador permite elegir el método idóneo para lograr delimitar y clasificar especies de acuerdo con las necesidades y características de las mismas, además de proporcionar herramientas para identificarlas incluso entre especies estrechamente relacionadas (Dayrat, 2005).

Los recientes antecedentes sobre la intrincada identidad taxonómica de *P. butleri* y *P. nelsoni* detectaron linajes divergentes en estudios sobre algunos géneros de la Familia Poeciliidae (Mateos *et al.*, 2002; Mateos, 2005), razón por la cual se realizaron hipótesis sobre la existencia de más de una especie, es decir sobre la validez de su entonces sinónimo *P. nelsoni*, esta hipótesis se comprobó en el estudio molecular de Palacios *et al*, (2016) en donde se instaló a *P. nelsoni* como especie válida; sin embargo, nunca se aplicaron más métodos exploratorios, como los

basados en caracteres morfológicos tradicionales y contemporáneos entre *P. butleri* y *P. nelsoni*.

El enfoque de este trabajo fue delimitar a *P. butleri* y a *P. nelsoni*, implementando una taxonomía integradora basada en métodos moleculares, morfológicos y morfométricos. Los resultados corroboran los hallazgos de los anteriores estudios, ya que los análisis moleculares de las poblaciones de *P. butleri* y *P. nelsoni* basados en las relaciones entre el genotipo Cytb no mostraron la existencia de flujo génico entre las dos especies, lo que permitió discernir completamente entre ambas especies y delimitar la distribución de *P. butleri* hacia el norte de México desde el ENTM hasta el estado de Sinaloa y la de *P. nelsoni* hacia el sur desde el ENTM hasta el estado de Chiapas.

Sin embargo, los resultados morfológicos contrastan ya que no se encontró algún carácter específico que logre discriminar completamente a una especie de otra a simple vista, esto no significa que no sean especies válidas, más bien los resultados permiten catalogar a ambas como especies crípticas (Avice, 1990), lo que indica la necesidad de basarse en la distribución geográfica, análisis genéticos e incluso la forma del cuerpo para identificar o segregar ambas especies.

Es conocido que las especies en donde la diferenciación genética supera a la morfológica suelen tener un origen muy reciente y por lo tanto no tener los caracteres morfológicos y moleculares igualmente diferenciados (Avice, 1990).

La naturaleza críptica de ambas especies parece ser resultado de los eventos geológicos que dieron origen al ENTM debido a la compleja historia biogeográfica, climática y geológica. Mateos (2005) comprobó que la formación del ENTM es responsable de la divergencia vicariante norte-sur de dos clados de *Poeciliopsis* y del ancestro común de *P. butleri* y *P. nelsoni*. La actividad tectónica durante el Plioceno tardío produjo una depresión geológica conocida como la fosa de Colima (Luhr y Carmichael, 1981) que permite la conexión entre las cuencas del norte y sur del ENTM. Fue a través de esta conexión que el ancestro común de *P. butleri* y *P. nelsoni* colonizó el noroeste de México cruzando desde el sur. Después, durante el vulcanismo del Plioceno y el Pleistoceno la conexión se interrumpe causando un evento de especiación vicariante que dio origen a *P. butleri* y *P. nelsoni*.

Eventos geológicos como estos, así como fluctuaciones climáticas transformaron parte del altiplano mexicano durante el Pleistoceno, principalmente en el ENTM, lo que resulta en una zona que ha promovido la persistencia a largo plazo de la biodiversidad, así como eventos recientes de divergencia y especiación local de la biodiversidad (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015).

Es indispensable entender y comprender que los procesos evolutivos involucrados, la biogeografía histórica, la ecología y las regiones biogeográficas en conjunto con pueden hacer del cripticismo un fenómeno común entre algunos taxones, lo que no los hace eventos aleatorios (Pfenninger y Schwenk, 2007).

En múltiples estudios que abordan a las especies crípticas parece evidente que subestimar la diversidad de especies, afecta a su conservación (Theodoridis *et al.*, 2019; Geoffroy *et al.*, 2016; M'hamed *et al.*, 2016). *P. butleri* y *P. nelsoni*, tomados como sinónimos por Martínez *et al.* (2005), conllevaron a la presentación de resultados parciales para proponer el cambio de estatus en la categoría de riesgo de *P. butleri*, la cual se encontraba bajo la categoría “amenazada” dentro de la entonces vigente Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000.

La propuesta se basó en análisis de campo y bibliográfico como la distribución histórica y actual; el medio y estado actual del hábitat; historia natural; categorías de riesgo y el método MER de evaluación de riesgo de extinción de las especies. Dado que en ese momento la distribución de *P. butleri* se consideraba amplia a lo largo de la costa oeste de México desde Sinaloa hasta Chiapas además de considerarse una especie muy resiliente a los cambios de hábitat, los resultados de la evaluación MER determinaron que aunque existen impactos ambientales y antropogénicos, no se observaron disminuciones significativas en las poblaciones ni en los rangos de distribución de *P. butleri*, por lo que se propuso el cambiar su categoría de riesgo de amenazada a Protección especial (Martínez *et al.*, 2005).

Actualmente en la NOM-059-SEMARNAT-2010 *P. butleri* se encuentra en la categoría de protección especial, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2010); sin embargo, en este listado se trata a *P. butleri* como una sola especie. La revalidación de *P. nelsoni* supone una reducción de casi la mitad del área de distribución de *P. butleri*, razón por la cual su categoría de riesgo asignada podría ser inadecuada, de esta forma poniendo en riesgo su conservación.

El uso conjunto de diversos métodos se muestra necesario para comprender claramente la biodiversidad y la unidad básica de clasificación de los organismos, la especie, ya que permite explorar la complejidad de la vida de mejor forma, puesto que el proceso de especiación no siempre implica que los caracteres deban ser dependientes para poder delimitar, describir o identificar especies (Jörger y Schrödl, 2013).

IX. CONCLUSIONES

- *P. butleri* y *P. nelsoni* son especies monofiléticas, formando dos clados bien definidos al norte y sur del ENTM, así mismo no existe evidencia de flujo genético entre ellas.
- La variabilidad en los caracteres morfométricos y merísticos muestran un claro traslape en el espacio multivariante entre las poblaciones de *P. butleri* y *P. nelsoni*.
- La forma del cuerpo en morfometría geométrica permite separar a las especies, con una clara distinción entre los machos y un poco de solapamiento en las hembras.
- *P. butleri* y *P. nelsoni* son especies crípticas que sólo pueden ser identificadas molecular y geográficamente.
- El ENTM constituye una barrera biogeográfica entre *P. butleri* y *P. nelsoni*.
- Como especies válidas e independientes *P. butleri* y *P. nelsoni* necesitan ser tratadas en todos los ámbitos como especies diferentes con necesidades, distribuciones, descripciones y protecciones adecuadas a sus necesidades para garantizar su aporte a la diversidad y por consiguiente su conservación.

X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios exploratorios en *P. butleri* y *P. nelsoni* en el gonopodio y su suspensión, ya que han constituido la base principal para la separación de tribus, géneros, especies y, al menos en algunos casos, subespecies.
- Realizar estudios para determinar la categoría de riesgo a la que deberían pertenecer *P. butleri* y *P. nelsoni* de acuerdo con su nueva clasificación taxonómica y distribución para su correcta conservación.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abascal, F., Irisarri, I. y Zardoya, R. 2014. Filogenia y evolución molecular. (Eds) En: Abascal, F., Aguirre, A., Andres-Leon, E., Bajic, D., Calabuig, B., Cortés-Cabrera, I., Dotu, I., Fernández, H., Santos, B., García-Jimenez, R., Irisarri, I., Jiménez-Lozano, N., J. Klett, R. Mendez, A. Morreale, A. Pascual-Garca, A. Perona, A. Sebastian, M. Stich, S. Tarazona, I. Yruela y R. Zardoya. *Bioinformática con Ñ*. CreateSpace. Pp. 231–259.
- Abdi, H. y Williams, L.J. 2010. Computational statistics: Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews.*, 2(4): 433–459. doi:<https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- Ángulo, A. 2021. Panorama general de los métodos multivariados. Universitas Major Pacensis. La Paz, Bolivia.
- Ajawatanawong, P. 2016. Molecular phylogenetic: Concepts for a Newcomer. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 160: 185-196.
- Avise, J.C. 1990. Flocks of African fishes. *Nature*. 347:512-513.
- Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1nzfgj7>. Consultado el 21 de abril de 2023.
- Bandelt, H., Forster, P. y Rohlf, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. 2015. Nucleic acids research. GenBank.
- Betancourt-Resendes, I., Pérez-Rodríguez, R., Barriga-Sosa, K. Piller, R. y Domínguez- Domínguez. O. 2019. Patrones filogeográficos y delimitación de especies en el clado “humboldtianum” del pejerrey (Piscis: Atherinopsidae) en peligro de extinción en el centro de México: entendiendo su historia evolutiva. *Org Divers E*. 20: 313–330.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K. y Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22(3): 148-155.

- Bookstein, F., Chernoff, B., Elder, R. L., y Strauss, R. E. 2014. Morphometrics In Evolutionary Biology. *Biometrics*. 42(4).
- Bookstein, F., Chernoff, B., Elder, R., Humphries, J., Smith, G y Strauss, R. 1985. Morphometrics in evolutionary biology. *Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 15: 1-277.
- Bloch, M. E., y Schneider, J. O. G. 1801. *Systema ichthyologiae*. Berlin.
- Brown, T. A. 2002. Molecular Phylogenetics. En: Brown, T. A. (Eds). *Genomes*. Oxford: Wiley-Liss. Inglaterra.
- Bottero, M.T. y Dalmasso, A. 2010. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. 190:34-38.
- Cardini, A., Nagorsen, D., O'Higgins, P., Polly, P. D., Thorington, R. W. Jr. y Tongiorgi, P. 2009. Detecting biological distinctiveness using geometric morphometrics: an example case from the Vancouver Island marmot. *Ethology, Ecology and Evolution*. 21: 209–223.
- Eschmeyer's Catalog of Fishes - CAS. 2023. Calacademy. org. <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/getref.asp?id=7067>. Consultado el 13 de agosto de 2022.
- Cassens, I., Mardulyn, P. y Milinkovitch, M.C. 2005. Evaluating intraspecific “network” construction methods using simulated sequence data: do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach?. *Systematic Biology*. 54: 363–372.
- Cisneros-Bernal, A. Y., Rodríguez-Gómez, F., Flores-Villela, O., Fujita, M. K., Velasco, J. A. y Fernández, J. A. 2022. La filogeografía apoya la divergencia de linaje para una serpiente de cascabel endémica (*Crotalus ravus*) del bosque montano neotropical en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista biológica de la Sociedad Linneana*, 137 (3): 496-512.
- Concejalia. 2011. I. PECES: 1. Morfología. Educación Cartagena. <https://educacion.cartagena.es/gestion/documentos/28930.pdf>. Consultado el 9 de febrero de 2024.

- Chi, L., Zhang, X., Xue, Y., y Chen, H. 2023. fastHaN: a fast and scalable program for constructing haplotype network for large-sample sequences. *Molecular Ecology Resources*.
- Clement, M., Snell, Q., Walke, P., Posada, D. y Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. *Proceeding 16th International Parallel Distributed Processing Symposium, Fort Lauderdale, FL, EE. UU.* Pp. 184.
- Clemente, M., Posada, D. C. K. A. y Crandall, K. A. 2000. TCS: un programa informático para estimar genealogías genéticas. *Ecología molecular*. 9(10): 1657-1659.
- Comisión Nacional del Agua. 2009. Inventario Nacional de Obras de Protección contra Inundaciones en Cauces Naturales, En: Organismo de Cuenca III Pacífico Norte México. D.F. Pp. 75.
- Coyle, T. 1998. Identificación de poblaciones y gestión pesquera: la importancia de utilizar varios métodos en un estudio de identificación de poblaciones. *Hacer balance: definir y gestionar los recursos compartidos*. Sociedad Australiana de Biología Pesquera, Sydney. Pp.173-182.
- Crick, F. H. C. 1958. The biological replication of macro- molecules. *Society for Experimental Biology*. 12:138–163
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85(3): 407–415.
- De Luna, E. 2020. Integrando análisis morfométricos y filogenéticos: de la sistemática fenética a la morfometría filogenética. *ACTA BOTANICA MEXICANA*. (127).
- Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D. y Brown, H. M. 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*. 68: 431–438.
- Escalante, T. 2009. Un ensayo sobre la regionalización biogeográfica. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 551–560
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. y R. van der Laan. 2023. eschmeyer's catalog of fishes: genera/species by family/subfamily in. (<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Poeciliidae>). Consultado el 3 de septiembre de 2023.

Fishbase. 2023. Fish Identification. Mnhn.fr.
<https://fishbase.mnhn.fr/identification/SpeciesList.php?genus=Poecilia>.
Consultado el 3 de septiembre de 2023.

Gacitúa, S., Ciro, O., y Veas, R. 2008. Análisis multivariado de la morfometría y merística del robalo *Eleginops maclovinus* (Cuvier, 1830). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(3): 491-500.

Geoffroy, A., Destombe, C., Byeongseok, K., Myung, S. K., Mauger, S., Raffo, M. P. y Line Le Gall. 2016. Patterns of genetic diversity of the cryptogenic red alga *Polysiphonia morrowii* (Ceramiales, Rhodophyta) suggest multiple origins of the Atlantic populations. *Ecology and Evolution*, 6 (16): 5635–5647.

Halfpter, G. 2003. Biogeografía de la entomofauna de montaña de México y América Central. En: Morrone, J. y Llorente, J. Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía (Eds.). Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. Pp. 87-97.

Hartshorn, G. 2002. Biogeografía de los bosques neotropicales. En: Guariguata, M. y Kattan, G. Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales (Eds). Libro Universitario Regional. Estados Unidos. Pp. 59–81.

Hebert, P.D.N., Penton, E. H. y Burns, J. M. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(41):14812-14817.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S. L., y deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Ciencia*. 270:313–321

Hogg, I. D. y Hebert, P. D. N. 2004. Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*. 82:749-754

Hotelling, H. 1933. Análisis de un complejo de variables estadísticas en componentes principales. *Journal of Educational Psychology*. 24: 417-441 y 498-520.

- Humphries, J.M., Bookstein, F., Chernoff, B., Smith, G., Elder, R. y Ross, S. 1981. Multivariate discrimination by shape in relation to size. *Systematic Zoology* 30(3): 291-308.
- Instituto Nacional de Ecología. 2007. La cuenca del río Balsas. <https://web.archive.org/web/20070727055419/http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/402/cuencabalsas.html>. Consultado el 22 de marzo de 2024
- Jordan, D. S. 1889. BHL List of fishes collected by Alphonse Forrer about Mazatlan, with descriptions of two new species - *Heros beani* and *Poecilia butleri*. *Proceedings of the United States National Museum*. 11 (719): 330.
- Jörger, K. M., y Schrödl, M. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in zoology* 10(1): 1-27.
- Kapli, P., Yang, Z. y Telford, M. J. 2020. Construcción de árboles filogenéticos en la era genómica. *Nat Rev Genet*. 21: 428–444.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 11: 353-357.
- Knowlton, N. 1986. Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. *Journal of Crustacean Biology*. 6(3): 356–363.
- Leigh, J. W., Bryant, D. y Nakagawa, S. 2015. POPART: software con todas las funciones para la construcción de redes de haplotipos. *Métodos en ecología y evolución*. 6(9).
- Lozano-Fuentes, S., Fernandez-Salas, I. M., Garcia-Rejon, J., Olson, K. E., Beaty, B.J. y Black, W.C. 2009. The Neovolcanic Axis Is a Barrier to Gene Flow among *Aedes aegypti* Populations in Mexico That Differ in Vector Competence for Dengue 2 Virus. *PLOS neglected tropical diseases*. 3(6): 468.
- Luhr, J.F. y Carmichael, I.S.E. 1981. The Colima volcanic complex, Mexico: Part II. Late-Quaternary cinder cones. *Contributions to Mineralogy and Petrology*. 76: 127–147.
- Magalhães, L. A., y Jacobi, C. 2017. *Colorful invasion in permissive Neotropical ecosystems: establishment of ornamental non-native poeciliids of the genera*

Poecilia/Xiphophorus (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) and management alternatives. *Neotropical Ichthyology*.15(1).

- Manolopoulou, I., Legarreta, L., Emerson, B. C., Brooks, S. y Tavaré, S. 2011. A Bayesian approach to phylogeographic clustering. *Interface Focus*. 1: 909–921.
- Mateos, M. 2005. Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes) in central Mexico. *The Journal of Biogeography*.32(5): 775–780.
- Mateos, M., Sanjurjo, O. I., y Vrijenhoek, R. C. 2002. Historical biogeography of the livebearing fish genus *poeciliopsis* (poeciliidae: cyprinodontiformes). *Evolución* .56(5): 972–984.
- Martínez, R. E., Estrada G. y Mora M. P. F. 2005. Reclassification proposal for three species (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) in the Mexican Official Norm Project PROY-NOM-059-ECOL-2000. En: H. J. Grier y M. C. Uribe (eds.). Viviparous Fishes. New Life Publications, Homestead, FL, EUA. Pp. 576-578.
- Mastretta-Yanes, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D., Jorgensen, T.H. y Emerson, B.C. 2015. Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of biogeography*. 42(9): 1586–1600.
- Mastretta-Yanes, A., Xue, A.T., Moreno-Letelier, A., Jorgensen, T.H., Alvarez, N., Piñero, D. y Emerson, B.C. 2018. Long-term in situ persistence of biodiversity in tropical sky islands revealed by landscape genomics. *Molecular ecology*. 27(2): 432–448.
- Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. En: Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson, M.R. (Eds.), Species: The Units of Biodiversity. Chapman & Hall.
- Meek, S. E. 1904. The fresh-water fishes of Mexico north of the Isthmus of Tehuantepec. Field Columbian Museum. *Zoological Series*, 5(6): 87-163.
- Miller, R. R. 1955. Una revisión sistemática de los peces de América Central del género *Profundulus*. *Publicaciones varias del Museo de Zoología de la Universidad de Michigan*. 92: 1–64.

- M'hamed, M. K. C., Burban, C., Battisti, A., Gahdab Chakali, y Simonato, M. 2016. Genetic differentiation of the pine processionary moth at the southern edge of its range: contrasting patterns between mitochondrial and nuclear markers. *Ecology and Evolution*. 6(13): 4274–4288.
- Miguel, J. 2020. UMMZ 178472 - *Poecilia butleri* | Freshwater Fishes of Mexico. Mexfish.https://mexfish.info/species_collection_record.php?id=5210&lang=de . Consultado el 6 de noviembre de 2023.
- Miguez-Gutiérrez, Castillo, J., Márquez, J. y Goyenechea, I. 2013. Biogeografía de la Zona de Transición Mexicana con base en un análisis de árboles reconciliados. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 215-224.
- Miller, R. R., Minckley, W. L. y Norris, S. M. 2005. Freshwater Fishes of México. The University of Chicago Press. EE.UU.
- Miller, R. R. 1983. Checklist and Key to the Mollies of Mexico (Pisces: Poeciliidae: *Poecilia*, Subgenus *Mollienesia*). *Copeia*. 3: 817.
- Morehead, S. A, Seger J, Feener, D. H. Jr, Brown, B. V. 2001. Evidencia de un complejo de especies crípticas en el parasitoide de hormigas *Apocephalus paraponerae* (Diptera: Phoridae). *Investigación en Ecología Evolutiva*. 3 :273-284.
- Morrone J. y Márquez, J. 2001. Halffter's Mexican Transition Zone, beetle generalized tracks, and geographical homology. *Journal of Biogeography*. 28: 635-650.
- Morrone, J. 2004. Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. *Revista Brasileira de Entomología*. 48:149-162.
- Morrone, J. 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe. Manuales y Tesis SEA. 3: 53.
- Morrone, J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista mexicana de Biodiversidad*. 76(2): 207-252.
- Nelson, J. S. 2016. Fishes of the World (5th ed.). John Wiley y Sons, Inc., NewYork.
- Nelson, J.S. 1994. Fishes of the world. (3th ed). John Wiley y Sons, Inc., NewYork.

- Nico, L. G, Taphorn, D.C y Thomerson, J. E. 1987. Datos limnológicos pozos peces anuales (Cyprinodontidae) de los llanos venezolanos con una clave para su identificación. *Itrains fishes*. 2:138.
- Olmos, N. S. 2018. Descripción morfológica y funcional de las estructuras que producen color iridiscente en los peces *Xenotoca variata*. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Pace, N. R., Sapp, J. y Goldenfeld, N. 2012. Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Classic Perspective*. 109(4): 1011–1018.
- Palacios, M., Voelker, G., Rodriguez, L. A., Mateos, M., y Tobler, M. 2016. Phylogenetic analyses of the subgenus *Mollienesia* (Poecilia, Poeciliidae, Teleostei) reveal taxonomic inconsistencies, cryptic biodiversity, and spatio-temporal aspects of diversification in Middle America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 103: 230-244.
- Palacios, M., González-Díaz, A. A., Arias-Rodríguez, L., Mateos, M., Rodiles-Hernández, R., Tobler, M. y Voelker, G. 2023. Population level genetic divergence and phylogenetic placement of Mexican shortfin mollies (*Mollienesia*: *Poecilia*: *Poeciliidae*). *Neotropical Ichthyology*. 21(2).
- Parenti, L. R., Clayton, J. M., y Howe, J. C. 1999. Catalog of type specimens of recent fishes in the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *Smithsonian Contributions to Zoology*. 604: 1–22.
- Pante, E., Schoelinck, C. y Puillandre, N. 2014. From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. *Systematic biology*. 1: 152–160.
- Pearson, K. 1901. Sobre líneas y planos de ajuste más cercano a sistemas de puntos en el espacio. *Philosophical Magazine*. 2 (11): 559-572.
- Peña, C. 2024. Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*. 18(2): 265–267.
- Pfenninger, M., y Schwenk, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC evolutionary biology*. 7(1): 1-6.

- Poeser, F. N. 2011. A new species of *Poecilia* from Honduras (Teleostei: Poeciliidae). *Copeia*. 3: 418-422.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. URL <https://www.R-project.org/>. Consultado el 28 de mayo de 2022.
- Riddle, B. R., Dawson, M. N., Hadly, E. A., Hafner, D. J., Hickerson, M. J., Mantooth, S. J., y Yoder, A. D. 2008. The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*. 32(2): 173-202.
- Rico, C. N., Hoagstrom, C. W., Elías, D.J., McMahan, C. D. y Matamoros, W.A. 2022. Biotic regionalization of freshwater fishes in Northern Middle America highlights high beta diversity created by prominent biogeographic barriers. *Frontiers of biogeography*. 14(4).
- Ríos, N, Bouza, C., Gutiérrez, V y García, G. 2017. Species complex delimitation and patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish (Rhamdia: Heptapteridae). *Environmental Biology of Fishes*. 100(9): 1047–1067.
- Reznick, D. N., Furness, A., Meredith, R. W., y Springer, M. S. 2017. The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. 12(3), e0172546–e0172546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172546>
- Robinson, D. F., y Foulds, L. R. 1981. Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences, Plos one*. 53(1-2):131–147.
- Rodríguez Gómez, F. y Ornelas, J. F. 2015. En la puerta de paso: introgresión pasada en el proceso de formación de especies entre los colibríes *Amazilia violiceps* y *A. viridifrons* a lo largo de la Zona de Transición Mexicana. *Revista de biogeografía*. 42: 1305–1318.
- Rosen, D. E. y Bailey, R. M. 1963. The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography, and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 126 (1): 1-176.
- Rohlf, F. J. 2015. La serie de software tps. *Hystrix*. 26: 9-12.
- Sáez, A. 2009. Genes y especies. *Ecosistemas*. 18(1).

- Schultz, R. J. y Miller, R. R. 1971. Species of the *Poecilia sphenops* Complex (Pisces: Poeciliidae) in México. *Copeia*. 1971(2): 282–290.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 44.
- Sevilla, R. G., Diez, A., Noren, Mouchel., Jerome M., Verrez-Bagnis V., Van Pelt H., Favre Krey L., Krey G. y Bautista J. 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*. 7(5): 7330-7340.
- Soria-Barreto, M., Rodiles-Hernández, R. y González-Díaz, A. A. 2024. Morfometría de las especies de Vieja (Cichlidae) en ríos de la cuenca del Usumacinta, Chiapas, México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 82(2): 569–579.
- Strauss, R. E. y Bookstein, F. L. 1982. The Truss: body form reconstruction in morphometrics. *Systematic Zoology*. 31: 113-135.
- Smith, W. L., Chakrabarty, P. y Sparks, J. S. 2008. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics*. 24(5): 625-641.
- Scheepens, J. F. 2018. Bayesian statistics in phylogenetic inference - Student Theses Faculty of Science and Engineering. Tesis de maestría. Rijksuniversiteit Groningen. Groninga.
- Teacher, F. y Griffiths, D. J. 2010. HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular ecology resources*. 11(1): 151–153.
- Theodoridis, S., Nogués-Bravo, D., y Conti, E. 2019. The role of cryptic diversity and its environmental correlates in global conservation status assessments: Insights from the threatened bird's-eye primrose (*Primula farinosa* L.). *Diversity and Distributions*. 25(9): 1457–1471.

- Traldi J. B., Vicari M. R., Martinez J. F., Blanco, D. R., Lui, R. L., Azambuja M, de: Almeida, R. B., Cássia-Malimpensa, G., da Costa-Silva, G.J., Oliveira, C., Pavanelli, C. S. y Filho, O. M. 2020. Recent *Apareiodon* species evolutionary divergence (Characiformes: Parodontidae) evidenced by chromosomal and molecular inference. *Zoologischer Anzeiger*. 289: 166–176.
- Vences, M., Patmanidis, S., Schmidt, J. C., Matschiner, M., Miralles, A., y Renner, S. S. 2024. Hapsolutely: a user-friendly tool integrating haplotype phasing, network construction and haploweb calculation. *Bioinformatics Advances*. 083.
- Vivó, J. 1943. Los Límites Biogeográficos en América y la Zona Cultural Mesoamericana. *Revista Geográfica*. 7 (9): 109–131.
- Ward, R. D., Zemlak, T.S. y Innes, B. H. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* . 360(1462): 1847-1857.
- Wischnath, L. 1993. Atlas de portadores de vida del mundo. TFH Publications, Inc., Estados Unidos de América.
- Winans, G. 1987. Utilizar caracteres morfométricos y merísticos para identificar poblaciones de peces. *Servicio Nacional de Pesca Marina Centro de Pesca del Noroeste y Alaska*.199(2): 25.
- Winker, K. 2005. Sibling species were first recognized by William Derham (1718). *the Auk/the Auk*. 122(2): 706–707.
- Will, K.W., Mishler, B. D. y Wheeler, Q. D. 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic biology*. 54(5): 844–851.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. y Fink, W. L. 2004. Geometric Morphometrics for Biologists: Elsevier Academic Press, New York and London.
- Zúñiga-Vega. J, Suárez-Rodríguez. M, Espinosa-Pérez. H y Johnson, J. R. 2011. Morphological and reproductive variation among populations of the Pacific molly *Poecilia butleri*. *Journal of Fish biology*. 79(4): 1029–1046.

XII. ANEXOS

Cuadro 1. Ubicación de las secuencias de Cytb de *P. butleri* y *P. nelsoni*.

especie geográfica	especie original identificada	código de acceso	Localidad	LATTITUD	LONGITUD
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626891	Barra de Navidad, Jalisco, México	19.20259	-104.681
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626890	Coquimatlan, río Armeria, Colima, Mexico	19.14512	-103.865
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626860	Estero Cabildo, Chiapas, Mexico	14.72221	-92.4209
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626861	Estero antes de Puerto Arista, Chiapas, Mexico	15.93796	-93.7792
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626862	Rio Carrizal, Mazatlán, Oaxaca, Mexico	18.03013	-96.9135
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626863	Rio Ayutla, Oaxaca, México	17.0138	-96.0898
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626864	Puente Coyula, Oaxaca, México	15.7508	-96.2977
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626865	Puente Bajos de Chila, Oaxaca, Mexico	15.92238	-97.1184
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	KT626867	Río Marquelia, Guerrero, Mexico	16.58316	-98.8197
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	KT626868	Coyuca de Catalan, Guerrero, Mexico	18.32862	-100.695
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	KT626869	Canal en Santa Cruz, Guerrero, Mexico	17.76948	-98.561
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	HQ677864	Cihuatlan, Jalisco	19.23945	-104.553
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	HQ677865	San Blas, Nayarit	21.53844	-105.291
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368082	1 Río Choix	26.73017	-108.31
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368083	3 Río Sinaloa	25.724	-108.391
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368084	3 Río Sinaloa	25.724	-108.391
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368085	4 Río Evora	25.5065	-107.765
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368086	5 Río Evora	25.5065	-107.765
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368087	8 Río Elota	23.95917	-106.714
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368088	2 Río Culiacan	25.09417	-107.694
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368089	5 Arroyo de las Higueras	24.12217	-106.895
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368090	9 Río el Quelite	23.5215	-106.498
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368091	5 Arroyo de las Higueras	24.12217	-106.895
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368092	9 Río El Quelite	23.5215	-106.498
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368093	10 Río Presidio	23.2815	-106.056

<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368094	13 Río San Pedro Mezquital	22.12467	-105.202
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368095	11 Río Baluarte	23.03133	-105.692
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368096	11 Río Baluarte	23.03133	-105.692
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368097	12 Río Acaponeta	22.53767	-105.294
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368098	12 Río Acaponeta	22.53767	-105.294
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368099	13 Río San Pedro Mezquital	22.12467	-105.202
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368100	13 Río San Pedro Mezquital	22.12467	-105.202
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368101	13 Río San Pedro Mezquital	22.12467	-105.202
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368102	13 Río San Pedro Mezquital	22.12467	-105.202
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368103	13 Río San Pedro Mezquital	22.12467	-105.202
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368104	14 Río El Palillo	21.6415	-105.142
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368105	14 Río El Palillo	21.6415	-105.142
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368106	17 Río Piedras	21.25117	-105.17
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368107	15 Bahía Matachen	21.459	-105.187
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368108	18 Río Piedras	21.201	-105.094
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368109	17 Río Piedras	21.25117	-105.17
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368110	17 Río Piedras	21.25117	-105.17
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368111	19 Río María García	20.0055	-105.47
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368112	23 Río Armería	19.31883	-103.817
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368113	23 Río Armería	19.31883	-103.817
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368114	24 Río Marabasco	19.2135	-104.207
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368115	25 Río Armería	19.194	-103.837
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368116	26 Río Coahuayana	18.97733	-103.699
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368117	28 Laguna de Mezcala	18.65433	-103.702
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368118	27 Río Ticuiz	18.67233	-103.675
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368119	29 Arroyo El Tuzal	17.47833	-101.246
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368120	29 Arroyo El Tuzal	17.47833	-101.246
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368122	31 Río Nusco	17.22033	-100.751
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368123	31 Río Nusco	17.22033	-100.751
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368124	30 Arroyo El Papayo	17.03467	-100.249

<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368125	30 Arroyo El Papayo	17.03467	-100.249
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368126	30 Arroyo El Papayo	17.03467	-100.249
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368127	30 Arroyo El Papayo	17.03467	-100.249
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368128	32 Río Cortés	16.7765	-99.511
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368129	33 Río Tila	16.58283	-98.7855
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368130	33 Río Tila	16.58283	-98.7855
<i>Poecilia nelsoni</i>	<i>Poecilia butleri</i>	JN368131	34 Río Grande	15.99567	-97.422
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	KT626889	San Blas, Nayarit, México	21.5449	-105.273
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	KF276614	San Pedro, Nayarit, México	21.21295	-104.74
<i>Poecilia butleri</i>	<i>Poecilia butleri</i>	KF276613	San Pedro, Nayarit, México	21.21295	-104.74

Cuadro 2. Ubicación de los sitios de colecta de los lotes de ECOSUR de *P. butleri* y *P. nelsoni*

Lote	Estado	Especie original	Especie Geografica	LAT decimal	LONG decimal	
4550	Chiapas	<i>sphenops</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.96972	-93.7089
4627	Chiapas	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.96972	-93.7089
5032	Chiapas	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.76722	-93.5186
5916	Chiapas	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.10889	-92.7658
6379	Chiapas	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.77556	-93.4622
7126	Oaxaca	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	16.09139	-95.4061
7129	Oaxaca	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.91225	-97.1206
7130	Guerrero	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	16.57639	-98.4597
7131	Chiapas	<i>sphenops</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	16.58417	-93.8678
7354	Oaxaca	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	15.71914	-96.607
7355	Oaxaca	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia nelsoni</i>	16.24145	-95.1574
7894	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	22.03667	-104.862
7926	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.95944	-104.958
8015	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.94833	-105.05
8021	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.94833	-105.05
8037	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.96889	-105.056
8044	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.96778	-105.117
8103	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.95231	-105.311
8242	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.81944	-105.426
8335	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.79694	-105.449
9864	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	22.00528	-105.236
13123	Nayarit	<i>butleri</i>	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia butleri</i>	21.645	-104.807