



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**IDENTIDAD ESPECÍFICA DE LA CARPA DEL
DESIERTO (*Gila eremica* DeMarais, 1991) EN LAS
CUENCAS DE LOS RÍOS SONORA Y MÁTAPE,
SONORA.**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

CARLOS ALONSO BALLESTEROS CÓRDOVA

Hermsillo, Sonora, México

Enero de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctor en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Carlos Alonso Ballesteros Córdoba

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

IDENTIDAD ESPECÍFICA DE LA CARPA DEL DESIERTO (*Gila eremica* DeMarais, 1991)
EN LAS CUENCAS DE LOS RÍOS SONORA Y MÁTAPE, SONORA.

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

Presenta:

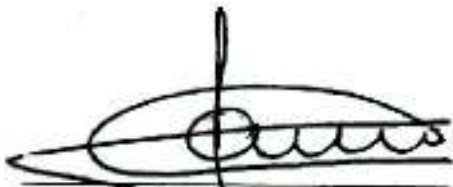
CARLOS ALONSO BALLESTEROS CÓRDOVA

Hermosillo, Sonora, México

13 de Enero de 2017

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada "Identidad específica de las poblaciones de la carpa del desierto (*Gila eremica* DeMarais, 1991) en las cuencas de los ríos Sonora y Mátape, Sonora", presentada por Carlos Alonso Ballesteros Córdova, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. Alejandro Varela Romero
Director



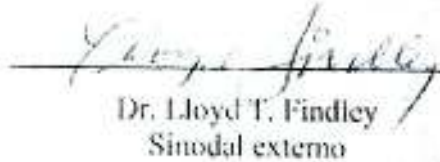
Dr. José Manuel Grijalva Chon
Sinodal Secretario



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Sinodal



Dr. Gorgonio Ruiz Campos
Sinodal externo



Dr. Lloyd T. Findley
Sinodal externo

DEDICATORIA

A toda mi familia, amigos, a mi novia y todas esas personas importantes que siempre me han apoyado e inspirando para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico en el financiamiento de mi posgrado y el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad de Sonora y al Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por brindarme la formación académica para superarme, además de darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis.

Al Consejo de los Peces del Desierto (*Desert Fishes Council*) por el apoyo otorgado para financiar parte de mi investigación y por brindarme la oportunidad de exponer mis avances de tesis en sus congresos.

Mucho agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Alejandro Varela, que desde la licenciatura me ha guiado en el campo de la biología brindándome apoyo, consejos, dedicación, paciencia y amistad... ¡Muchísimas gracias!

A mis sinodales internos, Dr. José Manuel Grijalva Chon y Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán, por sus consejos, sugerencias, apoyo y dedicación en la elaboración de esta investigación. A mis sinodales externos, Dr. Lloyd T. Findley por todos sus consejos y sugerencias aportadas para mi trabajo, además de su tiempo y dedicación en la edición al inglés de los productos generados durante esta investigación. Al Dr. Gorgonio Ruiz Campos que me brindó la oportunidad de realizar una estancia de investigación y recibirme en su laboratorio, además de su dedicación para apoyarme en mi trabajo. Muchas gracias a todos.

Un agradecimiento a todos los que aportaron para la obtención de las muestras utilizadas en este proyecto. A Richard Felger y Jesús Sánchez-Escalante por notificar la presencia de peces en las pozas de los cañones durante sus salidas de campo, a Michael T. Bogan, Nohemí Noriega Félix, Sylvette L. Vidal Aguilar, Celso Haros Méndez, Emmanuel M. Bernal Loaiza y Dylann Córdova Martínez por su apoyo en la recolecta de muestras. Además a Ramón Villafaña y José Ines Ramírez por permitirnos el acceso a los sitios de recolecta. Thomas Dowling y Charlotte Johnston de la Universidad Estatal de Arizona por proveer paratipos de *Gila* para análisis morfométricos.

A las personas que se encontraron en el Laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS. Nohelia G. Pacheco H. por brindarme sus consejos y asesoría en el uso de diferentes técnicas y análisis para darle mayor sustento a esta investigación. A todos los alumnos de Estancias de Investigación de la Licenciatura en Biología que me apoyaron de diferentes formas para realizar este trabajo.

A mi novia, Daniela, por su amor incondicional, además de su apoyo, motivación y ejemplo para superarme cada vez más.

A mis padres que siempre me han dado todo y gracias a ellos no me ha faltado nada en ningún sentido, a mi hermana por su ayuda en el diseño de figuras, a mi hermano por su apoyo, a todos mis amigos y el resto de mi familia que siempre me han motivado y apoyado para lograr mis metas.

RESUMEN

La carpa de desierto *Gila eremica* es una especie endémica al Estado de Sonora para las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y el alto Río Yaqui. Recientemente se registraron dos poblaciones de *Gila* en la subcuenca del Arroyo El Tigre de la cuenca del Río Mátape aparentemente relacionadas con *G. eremica*. Debido a que el aislamiento geográfico de las nuevas poblaciones registradas con respecto a *G. eremica* puede promover un evento de especiación es necesario confirmar de su identidad específica por varios criterios biológicos. El objetivo de este estudio fue realizar una caracterización de las poblaciones del linaje de *G. eremica* en su distribución conocida. Para cumplir con este objetivo se realizaron análisis morfométricos y distintos análisis moleculares con marcadores mitocondriales. Los resultados del análisis morfométrico por el Protocolo box-truss mostraron a *G. cf. eremica* como una unidad morfológicamente y merísticamente distinguible de *G. eremica*. Los análisis de inferencia filogenética (*Cyt-b*) indicaron monofilia entre *G. cf. eremica* y *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape y adicionalmente el análisis del reloj molecular (*Cyt-b*) mostró una divergencia de 5.60 Ma entre ellas, lo que concuerda con eventos geológicos locales. El código de barras del ADN (*COXI*) discriminó a *G. cf. eremica* de *G. eremica* por un cambio fijo en la posición 505 de su secuencia. Los análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de *G. eremica* indicaron diferenciación entre las poblaciones de las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre lo que sugiere manejarlas como unidades independientes. Los distintos análisis morfológicos y moleculares revelan a *Gila cf. eremica* como una unidad biológica evolutiva independiente de *Gila eremica* que debe ser considerada una nueva especie dentro del linaje de *Gila eremica*.

ABSTRACT

The desert chub *Gila eremica* is an endemic species to the State of Sonora for the Sonora, Mátape and Upper Yaqui River basins. Recently two populations of *Gila* were recorded in the Arroyo El Tigre subbasin of the Mátape River basin apparently related to *G. eremica*. Because the geographic isolation of the new populations recorded with respect to *G. eremica* may promote a speciation event it is necessary to confirm their specific identity by several biological criteria. The objective of this study was to characterize populations of the *G. eremica* lineage in their known distribution. Morphometric analyzes and molecular analyzes with several mitochondrial markers were performed to carry out this objective. The results of the morphometric analysis by the box-truss Protocol showed *G. cf. eremica* as a morphologically and meristically distinguishable unit of *G. eremica*. Analyzes of phylogenetic inference (*Cyt-b*) indicated monophyly between *G. cf. eremic* and *G. eremica* from the Mátape River subbasin and additionally the analysis of the molecular clock (*Cyt-b*) showed a divergence time of 5.60 Mya between them, which agrees with local geological events. The DNA barcoding technique (*COXI*) discriminated *G. cf. eremica* from *G. eremica* by a fixed change in the position 505 of its sequence. Genetic variability analyzes for populations of the *G. eremica* lineage indicated differentiation between populations of the Sonora and Mátape River basins and The Arroyo El Tigre subbasin, suggesting that they should be managed as independent units. The morphological and molecular analyzes reveal *Gila cf. eremica* as an evolutionary biological unit independent of *Gila eremica* that should be considered a new species within the *Gila eremica* lineage.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	7
I.1. Filogenia, sistemática y taxonomía del género <i>Gila</i>	7
I.2. El complejo <i>robusta</i> del Río Colorado	10
I.3. Las especies del género <i>Gila</i> en México	12
I.4. Estado actual de <i>Gila eremica</i> y nuevos registros de poblaciones aisladas	15
I.5. Análisis morfométricos para caracterizar unidades biológicas	18
I.6. El Código de barras del ADN	21
I.7. Análisis de genética de poblaciones y análisis filogenéticos en peces	25
II. HIPÓTESIS	29
III. OBJETIVOS	31
III.1. Objetivo general	31
III.2. Objetivos particulares	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	33
IV.1. Recolecta de ejemplares	33
IV.2. Caracterización morfométrica	33
IV.3. Extracción de ADN y amplificación por PCR de los genes <i>Cyt-b</i> , <i>ND2</i> y <i>COXI</i>	39
IV.4. Análisis filogenéticos y estimación del tiempo de divergencia para el linaje de <i>Gila eremica</i>	40
IV.5. Análisis del código de barras del ADN basado en caracteres	43

	Página
IV.6. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i>	44
V. RESULTADOS	47
V.1. Caracterización morfométrica del linaje de <i>Gila eremica</i>	47
V.2. Variación en las secuencias del gen mitocondrial <i>Cyt-b</i> para las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i>	53
V.3. Relaciones filogenéticas y tiempo de divergencia de las poblaciones del linaje de <i>G. eremica</i>	56
V.4. Discriminación de <i>Gila cf. eremica</i> por medio del código de barras del ADN	57
V.5. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i>	63
VI. DISCUSIÓN	71
VI.1. Eventos relacionados con la especiación de ciprínidos en Norte América	71
VI.2. Evidencia de morfotipos al interior de <i>Gila eremica</i>	73
VI.3. Filogenia y divergencia genética de linajes al interior de <i>Gila eremica</i> ...	74
VI.4. Caracteres diagnósticos para la discriminación de linajes de <i>Gila eremica</i>	79
VI.5. Variabilidad genética al interior de los linajes de <i>Gila eremica</i>	81
VI.6. Análisis de las evidencias de la presencia de <i>Gila cf. eremica</i> como una nueva entidad evolutiva al interior del linaje de <i>Gila eremica</i>	83
VII. CONCLUSIONES	87
VIII. RECOMENDACIONES	91
IX. LITERATURA CITADA	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización geográfica de los sitios de recolecta para los ejemplares de <i>Gila</i> analizados en el presente estudio. Los números en los círculos negros representan las localidades que están detalladas en la Tabla 1. Las divisiones hidrográficas son representadas por líneas gruesas. Las líneas discontinuas indican cursos de drenaje intermitentes. Las estrellas indican centros urbanos.	37
2	Marcas de referencia para el protocolo de box-truss utilizadas en especímenes de <i>Gila</i> analizados. Ver la Tabla 2 para explicación de los códigos de las mediciones. El espécimen de la imagen representa a <i>Gila</i> cf. <i>eremica</i> .	38
3	Diagrama de árbol resultante de las distancias cuadráticas de Mahalanobis para las poblaciones de <i>Gila</i> analizadas.	51
4	Gráfico de dispersión de las poblaciones de <i>Gila</i> analizadas (ver Tabla 6 para los coeficientes estandarizados de las variables canónicas).	52
5	Gráficos de cajas (medias e intervalos de confianza de 0.95) de las variables morfométricas y merísticas más distinguibles para discriminar a <i>Gila</i> cf. <i>eremica</i> .	54
6	Gráficos de cajas (medias e intervalos de confianza de 0.95) de las variables morfométricas y merísticas más distinguibles para discriminar a <i>Gila</i> cf. <i>eremica</i> .	55
7	Árbol filogenético resuelto con el gen <i>Cyt-b</i> por Máxima verosimilitud (modelo de evolución GTR + G + I) para todos los integrantes del linaje de <i>Gila</i> y otros miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth <i>et al.</i> , 2012, 2014). Los números en los nodos representan el soporte de bootstrap (BP > 65%)/Inferencia bayesiana (PP > 70%). Los asteriscos (*) representan especímenes de la subcuenca del Arroyo El Tigre.	58
8	Árbol filogenético resuelto por Máxima verosimilitud con el concatenado de los genes <i>Cyt-b</i> , <i>COXI</i> , y <i>ND2</i> (modelo de evolución GTR + G + I) para las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i> . Los números en los nodos representan las soporte de bootstrap (BP > 65%)/Inferencia bayesiana (PP > 70%). Los asteriscos (*) representan especímenes de la subcuenca del Arroyo El Tigre.	59

- 9 Tiempos estimados en millones de años (Ma) de divergencia entre las poblaciones del linaje de *G. eremica* incluyendo *G. purpurea*. Las barras sobre los nodos representan el tiempo de divergencia de los linajes y los valores en paréntesis bajo los nodos representan el 95% de los intervalos de credibilidad para los tiempos de divergencia. Los asteriscos (*) representan especímenes de la subcuenca del Arroyo El Tigre. 60
- 10 Árbol de distancias genéticas por K2P para el gen *COXI* de los *Gila* analizados. Los valores en los nodos representan el porcentaje de bootstrap. 61
- 11 Perfil de red haplotípica para el gen *COXI* de los especímenes de *Gila* analizados. Cada haplotipo es representado por un círculo. El tamaño de los círculos es proporcional a los organismos que presentaron el haplotipo mostrado. Los números en las líneas representan la posición de la mutación del gen. 62
- 12 Perfil de red haplotípica del gen *ND2* para las poblaciones del linaje de *G. eremica*. El tamaño de los círculos es proporcional a los organismos que presentaron el haplotipo mostrado. Las estrellas representan el median vector que separa a los haplogrupos resueltos. La línea que une a los haplotipos es proporcional a los pasos mutacionales. 66
- 13 Figura 13. Principales cuencas hidrológicas y provincias fisiográficas en el Noroeste de México y Suroeste de EUA. El mapa desplegado indica las principales áreas de estudio. Los mapas fueron modificados de Stock y Hodges (1989), Mora-Álvarez y McDowell (2000) Roldán-Quintana *et al.* (2004) y Minckley y Marsh (2009). Los límites de las cuencas hidrológicas están representados por líneas gruesas. Las líneas discontinuas indican flujos intermitentes. Los nombres en los círculos indican cuencas/subcuencas hidrológicas y las letras indican ríos o arroyos: 1 Cuenca Río Sonora, 2 Cuenca Río Mátape, 3 Cuenca Río Yaqui, 4 Cuenca Río De la Concepción, 5 Cuenca Río Mimbres-Casas Grandes, 6 Cuenca Río Grande (Bravo), 7 Cuenca Río Conchos, 8 Cuenca Río Mayo, 9 Cuenca Río Fuerte, 10 Subcuenca Río Gila, 11 Cuenca Pequeño Río Colorado, 12 Cuenca Río Colorado, 13 Cuenca Ríos Moapa-Virgin-White, 14 Subcuenca Río Green. A = Subcuenca Río Sonora, B = Subcuenca Río San Miguel, C = Subcuenca Río Mátape, D = Arroyo El Tigre, E = Subcuenca Río Altar, F = Subcuenca Río Magdalena, G = Arroyo El Largo en la subcuenca del Río Bavispe, H = Arroyo San Bernardino en la subcuenca del Río Bavispe. 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Lista de las localidades de recolecta para los ejemplares de <i>Gila</i> utilizados en este estudio para análisis morfométricos y moleculares. USON = Universidad de Sonora, Hermosillo; MNCN = Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España; UAIC = University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama, EUA; BYU = Brigham Young University, Provo, Utah, EUA. N/A indica que los organismos no fueron utilizados para análisis morfológico.	34
2	Medidas lineales (distancias) basadas en el protocolo de box-truss y caracteres merísticos cuantificados para las poblaciones de <i>Gila</i> spp. en Sonora, México. En la Figura 2 se observan los números de los códigos para marcas de referencia. M = medida.	38
3	Taxa, marcadores moleculares, números de acceso, números de catálogo y referencias de las fuentes de los ejemplares utilizados en los análisis de inferencia filogenética. Los detalles de las localidades de recolecta se Muestran en la Tabla 1.	41
4	Especies, localidades, números de catálogo y números de acceso al GenBank de las secuencias del gen <i>COXI</i> obtenidos en este estudio para el análisis del código de barras del ADN. Los detalles de las localidades (Loc) de recolecta se muestran en la Tabla 1.	45
5	Valores de significancia de lambda de Wilks (p) y tolerancia para 36 variables morfométricas y merísticas seleccionadas por el AFD para las especies de <i>Gila</i> analizados.	48
6	Coeficientes estandarizados de variables canónicas uno y dos resultantes del AFD para los datos morfométricos para poblaciones de <i>Gila</i> analizadas.	49
7	Código de barras del ADN para <i>G. cf. eremica</i> , <i>G. eremica</i> y <i>G. purpurea</i> basado en atributos característicos puros (sPu) obtenido por CAOS.	62
8	Distribución de las frecuencias haplotípicas de las siete poblaciones del linaje de <i>G. eremica</i> analizadas. H = Haplotipo.	65
9	Índices de diversidad molecular para las siete poblaciones del linaje de <i>G. eremica</i> analizadas. Ts = transiciones Tv = transversiones, Sus = Sustituciones, Spr = Sitios privados, Spo = Sitios polimórficos.	67

10	Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las siete poblaciones en conjunto del linaje de <i>G. eremica</i> .	68
11	Índices pareados de diferenciación genética (<i>Fst</i>) para las siete poblaciones del linaje de <i>G. eremica</i> . El asterisco (*) indica $P < 0.05$	68
12	Número de migrantes pareados calculados por <i>Fst</i> para las siete poblaciones del linaje de <i>G. eremica</i> .	68
13	Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i> .	69
14	Índices de diferenciación genética (<i>Fst</i>) pareados para los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i> . El asterisco (*) indica $P < 0.05$.	69
15	Número de migrantes por generación (<i>Nem</i>) pareados calculados por <i>Fst</i> para los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de <i>Gila eremica</i> .	69

INTRODUCCIÓN

La familia Cyprinidae es un grupo de peces teleósteos dulceacuícolas conocidos como carpas y distribuidos en varias regiones de África, Eurasia y Norteamérica. Existen aproximadamente más de dos mil especies y más de 200 géneros (Nelson, 1994). Al interior de la familia Cyprinidae, el género *Gila* Baird y Girard, 1853 incluye especies referidas como carpas occidentales y representan un grupo taxonómicamente muy complejo, distribuido en regiones áridas y semiáridas del Oeste de Norteamérica (Schönhuth *et al.*, 2012, 2014). Sus especies muestran morfologías muy similares, con variación en sus cuerpos, tallas y hábitats de ocupación (Schönhuth *et al.*, 2014).

La carpa del desierto, *Gila eremica* DeMarais, 1991 es una especie endémica al estado de Sonora (Miller *et al.*, 2006; Schönhuth *et al.*, 2014) que forma parte del grupo de las carpas occidentales. Ésta especie ha sido descrita para las cuencas de los ríos Sonora y Mátape, con pocos registros en una localidad de la subcuenca del Río Moctezuma en el alto Río Yaqui (Branson, 1960; DeMarais, 1991). Al igual que otras especies nativas al Estado de Sonora, las poblaciones de *G. eremica* han sido afectadas por la alteración de sus hábitats naturales e introducción de especies exóticas (Varela-Romero y Hendrickson, 2010). A pesar de lo anterior se desconoce el estado actual de sus poblaciones, lo que indica la falta de estudios para la especie.

Diversas expediciones realizadas en la región Sur de la Sierra El Aguaje cerca del área de San Carlos/Guaymas, Sonora han registrado nuevas poblaciones del género *Gila* en los cañones subtropicales La Balandrona y La Pirinola (Varela-Romero, 2001; Bogan *et al.*, 2014). La presencia de estas poblaciones de *Gila* en pozas conectadas entre sí por un arroyo somero intermitente perteneciente a la subcuenca del Arroyo El Tigre en la cuenca del Río Mátape, sugiere considerarlas parte del linaje de *G. eremica*. Sin embargo ambas poblaciones en los cañones se encuentran geográficamente aisladas del resto de las poblaciones de *G. eremica* previamente registradas en las cuencas de los ríos Sonora y Mátape. Debido a que el

aislamiento geográfico es un promotor de eventos de especiación (Mayr, 1954; Bohonak, 1999; Echelle *et al.*, 2000; Gould, 2002; Schönhuth *et al.*, 2015), las poblaciones de *Gila* (de aquí en adelante llamadas *Gila* cf. *eremica*) de la subcuenca del Arroyo El Tigre deben ser caracterizadas y comparadas con las poblaciones de la *G. eremica* nominal de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape.

Un criterio clásico en biología para la descripción y caracterización de especies y poblaciones es el uso de caracteres morfológicos. Los caracteres morfométricos y merísticos son los caracteres medibles y contables más comunes para la morfología de cualquier especie de pez (Strauss y Bookstein, 1982). Las marcas de referencia utilizadas en los análisis morfométricos describen la disposición espacial de las características anatómicas del organismo en estudio, lo que hace posible determinar y analizar la forma individual del pez (Barlow, 1961; Swain y Foote, 1999). El uso de estas marcas a partir del protocolo de enrejado o box truss (Strauss y Bookstein, 1982) han mostrado ser herramientas muy útiles para la identificación de poblaciones (Hossain *et al.*, 2010). Este tipo de estudios son complementados con los análisis de variables merísticas, donde se hace un recuento de las características cuantitativas de los peces, como el número de branquiespinas, número de vértebras, radios de las aletas y escamas en la línea lateral. Los análisis morfométricos y merísticos han sido útiles en estudios filogenéticos además de su uso en la diferenciación y determinación de especies de peces (Smith *et al.*, 1979; Corti y Crosetti, 1996; Corti *et al.*, 1996; Walker, 1996, 1997; Cavalcanti *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2001).

Adicionalmente el uso de las variables morfológicas ha sido complementado con los análisis moleculares para la caracterización de especies y poblaciones (DeMarais y Minckley, 1993; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2007, 2009). El gen Citocromo b (*Cyt-b*) es uno de los más utilizados en peces (Kocher *et al.*, 1989) y debido a su nivel de conservación media resulta muy útil para esclarecer las relaciones filogenéticas a nivel de género y familia (Lydeard y Roe, 1997; Hardman y Page, 2003). Este gen mitocondrial ha sido anteriormente utilizado en conjunto con los análisis morfológicos para determinar las relaciones filogenéticas de especies nuevas de ciprínidos (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2007; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2009).

La identificación y clasificación de especies hasta hace algunos años era un trabajo exclusivo para los taxónomos, y constituye una base nomenclatural y un requisito previo clave para una gran cantidad de estudios biológicos/taxonómicos. Sin embargo la identificación de organismos a partir de caracteres morfológicos se ha considerado en ocasiones arbitraria para la resolución a nivel especie (Packer *et al.*, 2009). Por otra parte, incluso bajo la visión de un experimentado taxónomo, la plasticidad fenotípica de algunos taxa puede llevar a errores de identificación (Nekola y Barthel, 2002; Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Actualmente los datos moleculares han mostrado una gran cantidad de especies biológicas con acumulación de divergencia genética sin poseer diferencias morfológicas, lo que impide identificarlas con el tradicional concepto morfológico de especie y vuelve más complicada la identificación de especies crípticas para los taxónomos modernos (Heinrichs *et al.*, 2011).

Los avances en sistemática molecular de los últimos años han generado diferentes herramientas para el estudio de la biodiversidad (Avice, 1994). El uso de secuencias cortas de ADN ha demostrado casi por 20 años su utilidad en separar unidades biológicas (Fišer-Pečnikar y Buzan, 2014). Actualmente, la técnica del código de barras del ADN ha sido aplicada como un método en taxonomía molecular para la identificación de especies y la revelación de especies crípticas (Hebert *et al.*, 2003a, b; Witt *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2010; Rach *et al.*, 2008). Los actuales enfoques disponibles para asignar códigos de barras a taxa incluyen el método basando en caracteres conocido como el sistema de organización de atributos característicos (CAOS, por sus siglas en inglés) (Sarkar *et al.*, 2008; Taylor y Harris, 2012). La aplicación de este enfoque radica en el uso de caracteres diagnósticos para la identificación y discriminación de unidades biológicas, al igual que los utilizados en la taxonomía tradicional (Rach *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Jörger y Schrödl, 2013). El enfoque del método basado en caracteres sostiene que los miembros de un grupo taxonómico comparten una combinación de atributos característicos únicos (e. g., polimorfismos de nucleótidos) que están ausentes de sus grupos más cercanos (Sarkar *et al.*, 2008; Taylor y Harris, 2012). De esta forma a partir del enfoque basado en caracteres, es posible identificar especies y detectar grupos taxonómicos a partir de la clasificación de especies desconocidas al tomar como base los caracteres diagnósticos detectados por el código de barras en especies previamente conocidas (Rach *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Jörger y Schrödl, 2013). Sin

embargo los enfoques moleculares en la identificación y discriminación de especies también pueden poseer ciertas limitaciones (Kress *et al.*, 2005) y a pesar de que el código de barras del ADN puede ser de gran ayuda para los taxónomos, esta técnica no puede remplazar completamente los análisis taxonómicos exhaustivos y la filogenia molecular. El código de barras del ADN no busca construir árboles filogenéticos, más bien provee una rápida y precisa identificación de especies no identificadas a partir de material de referencia previamente verificado (Sarkar *et al.*, 2008; Erickson y Kress, 2012).

Gran parte de los estudios evolutivos en biología se basan en establecer enlaces entre la ecología y la evolución de las especies y esto se puede realizar al cuantificar el nivel de diferenciación genética en las poblaciones (Bohonak, 1999). El comprender la microevolución requiere una cuantificación de como el flujo de genes entre las poblaciones interactúa con la deriva génica, selección natural y mutación (Bohonak, 1999). Los estudios de diferenciación genética poblacional son útiles en este sentido, ya que permiten determinar inferencias sobre como ciertas fuerzas microevolutivas han interactuado a lo largo de la historia de la especie (Bohonak, 1999). La diferenciación genética poblacional puede reflejar la selección natural, eventos de vicarianza y la cantidad de flujo de genes que ha ocurrido históricamente entre las poblaciones (Bohonak, 1999). Debido a que la diferenciación genética provee la materia prima para la selección natural, la diferenciación genética poblacional también puede indicar el potencial de adaptación local o especiación en un futuro (Bohonak, 1999).

Los estudios de genética poblacional a partir de diferentes marcadores moleculares, como nucleares y mitocondriales, han demostrado su utilidad en determinar estructura genética en diferentes poblaciones de peces, lo que ha sugerido el manejo independiente de cada una de ellas (Echelle *et al.*, 2000; Connelly *et al.*, 2006). Adicionalmente a partir de análisis genéticos ha sido posible clasificar poblaciones como unidades evolutivamente significativas (UES) separándolas de unidades de manejo (UM) con el fin de conservar cada una de las poblaciones (Lin *et al.*, 2008). Otros estudios relacionados han encontrado niveles moderados de diferenciación genética incluso en poblaciones aisladas por diferentes cuencas. Este resultado probablemente sugiere un ancestro en común en algún periodo prehistórico,

atribuido al posible intercambio de individuos que pudo haber resultado en un flujo de genes entre poblaciones en diferentes cuencas (Luhariya *et al.*, 2012).

La presencia de *G. cf. eremica* en la Sierra el Aguaje representa el primer registro para el género en cañones subtropicales de baja elevación y la ocurrencia de sus poblaciones en la subcuenca del Arroyo El Tigre sugiere una conexión ancestral de éste último con la subcuenca del Río Mátape. La falta de estudios para *G. eremica* y los nuevos registros para su linaje hacen necesaria su evaluación mediante diversos criterios biológicos. Por lo anterior se propone utilizar análisis morfométricos y diferentes marcadores mitocondriales para caracterizar sus poblaciones y contribuir en el conocimiento de la biología y sistemática del género *Gila* y al interior del linaje de *G. eremica*.

I. ANTECEDENTES

I.1 Filogenia, sistemática y taxonomía del género *Gila*

El género *Gila* Baird y Girard, 1853, forma parte de un complejo grupo de ciprínidos conocido previamente como el clado occidental (Coburn y Cavender, 1992) y recientemente redefinido por Schönhuth *et al.* (2012, 2014). Este grupo de peces habita ambientes áridos y semiáridos en la región Oeste de Norteamérica, en el Norte de México y Sur de Estados Unidos de América (EUA) (Coburn y Cavender, 1992; Simons y Mayden, 1998; Schönhuth *et al.*, 2014). El género *Gila* posee especies morfológicamente muy similares con variaciones morfológicas, además de mostrar distintas tallas y diversos hábitats de ocupación. La presencia de especies de *Gila* en porciones reducidas de sistemas de ríos en regiones áridas y semiáridas, junto con la degradación de sus hábitats y la introducción de especies exóticas, han puesto a gran parte de sus especies en peligro de extinción (FWS, 2010; SEMARNAT, 2010; IUCN, 2016).

La historia taxonómica y sistemática de este grupo de peces ha sido bastante compleja. De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2014) los primeros estudios relacionados con ciprínidos en Norte América proponían diferentes clasificaciones para especies actualmente consideradas al interior del género *Gila* (Miller, 1945; Bailey, 1956; Uyeno, 1960). El estudio realizado por Miller (1945) asignó al género *Gila* diez especies de *Cheonda*, *Gila*, *Siboma* y *Tigoma* y reconoció los subgéneros *Gila* Miller, 1945 (donde se incluían *G. robusta*, *G. elegans*, *G. minacae*, *G. nigrescens*), *Siboma* Girard, 1856 (con *G. atraria* y la extinta *G. crassicauda*), *Temeculina* Cockerell, 1909 (que incluía *G. orcutti*, *G. purpurea*, *G. ditaenia*) y estableció el subgénero *Klamathella* para *G. bicolor*. Posterior al trabajo de Miller (1945), Bailey (1956) asignó a *Clinostomus* y *Richardsonius* como sinonimia de *Gila*, sin embargo Uyeno (1960) descartó esa hipótesis y propuso a *Richardsonius* como el género más cercano a *Gila*. Adicionalmente incluyó a los géneros *Snyderichthys* y *Siphateles* dentro de *Gila*. Esta reorganización causó un arreglo del nombre científico para “*bicolor*” que era usado en *Gila* y *Siphateles*. De esta forma *Siphateles bicolor* fue cambiado a *Gila bicolor* y *Gila bicolor* pasó a

ser *G. coerulea* (Bailey y Uyeno, 1964). Estos cambios provocaron que varios autores (Uyeno, 1960; Miller y Hubbs, 1962; Miller, 1976) reestructuraran a las especies *Gila pandora* (Cope, 1872), *G. pulchra* (Girard, 1856), *G. conspersa* Garman, 1881 y *G. modesta* (Garman, 1881) como independientes de *G. nigrescens* (Girard, 1856).

Por otra parte algunos autores han considerado como válido al subgénero *Temeculina* (Miller, 1945; Barbour y Miller, 1978), sin embargo, de acuerdo a los análisis de Uyeno (1960) ese reconocimiento asignó como parafilético al subgénero *Gila* (Compuesto por *G. robusta*, *G. elegans*, *G. minacae*, *G. nigrescens*). A pesar de que los estudios de Simons y Mayden (1997, 1998) realizados para *Gila* incluían datos moleculares y morfológicos, no fue posible corroborar relaciones cercanas con *Richardsonius* y *Clinostomus* y no mostraron a estas dos últimas especies como parte de las 22 especies de ciprínidos del clado occidental propuesto por Coburn y Cavender (1992). Las relaciones filogenéticas resueltas para *Gila* que incluían a *Siphateles* y *Snyderichthys* indicaron que el género era parafilético. Sin embargo Simons y Mayden (1997, 1998) trataron de corregir este resultado y consideraron a *Siphateles* y *Snyderichthys* como géneros separados.

Más recientemente se realizaron análisis filogenéticos con marcadores nucleares (*Rag1*, *Rhod* y *S7*) y mitocondriales (*Cyt-b*) que incluían los 22 géneros de ciprínidos de Norteamérica representantes del clado occidental propuesto por Coburn y Cavender (1992). Estos resultados (Schönhuth *et al.*, 2012) reorganizaron al clado occidental en un grupo más reducido, nombrado como el clado occidental redefinido (COR). El COR mostró una nueva hipótesis filogenética y coloca al género *Gila* como hermano de los 11 géneros occidentales *Acrocheilus*, *Chrosomus*, *Eremichthys*, *Hesperoleucus*, *Lavinia*, *Moapa*, *Mylopharodon*, *Orthodon*, *Ptychocheilus*, *Relictus* y *Siphateles* (Schönhuth *et al.*, 2012). Al interior del COR la mayoría de las especies existentes de *Gila* formaron un linaje parafilético que incluía a los géneros monotípicos *Moapa* y *Acrocheilus* (Schönhuth *et al.*, 2012).

Los análisis posteriores a partir de genes nucleares (*Rhod*, *S7* y *Rag1*) y mitocondriales (*Cyt-b*) de todo el COR (Schönhuth *et al.*, 2014) corroboraron el resultado de Schönhuth *et al.*, (2012) y soportaron la integración de un linaje de *Gila*. Los resultados obtenidos con el gen mitocondrial *Cyt-b* mostraron un linaje constituido por las 19 especies conocidas para *Gila*

hasta ahora (*G. atraria*, *G. brevicauda*, *G. coerulea*, *G. conspersa*, *G. cypha*, *G. ditaenia*, *G. elegans*, *G. eremica*, *G. intermedia*, *G. minacae*, *G. modesta*, *G. nigra*, *G. nigrescens*, *G. orcutti*, *G. pandora*, *G. pulchra*, *G. purpurea*, *G. robusta*, *G. seminuda*) además de incluir a los géneros monotípicos *Acrocheilus*, *Moapa* y a la carpa gigante del Colorado *Ptychocheilus lucius*. Sin embargo los resultados de Schönhuth *et al.*, (2014) para el concatenado de los marcadores nucleares (*Rhod*, *S7* y *Rag1*) y éstos últimos al ser concatenados con el marcador mitocondrial (*Cyt-b*) fueron distintos al resultado obtenido con el uso individual de *Cyt-b*, ya que no mostraron a *Ptychocheilus lucius* ni a *G. coerulea* como integrantes del linaje de *Gila* (Schönhuth *et al.*, 2014). Lo anterior sugiere que los límites diagnósticos para el género *Gila* permanecen inconclusos, debido a la posición filogenética de *G. coerulea* y *Ptychocheilus lucius* fuera del linaje de *Gila*. Por lo tanto, hasta el momento el linaje de *Gila* se constituye de 21 o 23 especies según el marcador molecular considerado (nuclear o mitocondrial, respectivamente), lo que sugiere considerar un mayor muestreo de taxa y ampliar el número de caracteres para garantizar una mejor inferencia filogenética.

El reconocimiento de los géneros *Acrocheilus* y *Moapa* al interior del linaje de *Gila* colocó de nuevo a este último como un grupo parafilético y muestra deficiencias en cuanto al conocimiento de su historia natural, conservación y manejo. Por lo tanto Schönhuth *et al.*, (2014) sugieren que los géneros *Acrocheilus* y *Moapa* sean considerados como sinonimia de *Gila*.

De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2012, 2014) la posición de los géneros *Snyderichthys* y *Siphateles* anteriormente muy relacionados con *Gila* (Uyeno, 1960; Coburn y Cavender, 1992), son congruentes con los de Simons y Mayden (1998) y Dowling *et al.* (2002) donde *Snyderichthys* se mostró muy relacionado con Plagopterini, un clado muy lejano del COR conformado por los géneros *Lepidomeda*, *Meda* y *Plagopterus*. Además Schönhuth *et al.* (2012, 2014) resolvieron al género *Siphateles* dentro del clado Pikeminnow, que es incluido dentro del COR, sin embargo al igual que en trabajos anteriores, este género siempre se muestra separado del linaje de *Gila* (Simons y Mayden, 1998) y ninguno de los análisis de Schönhuth *et al.* (2012, 2014) recuperó a *Siphateles* como un grupo natural debido a que el complejo de *Siphateles bicolor* nunca se resolvió como hermano de *S. alvordensis* y *S.*

boraxobius. El género *Siphateles* se observó muy cercano al género *Ptychocheilus*, sin embargo Schönhuth *et al.* (2014) sugieren que *Siphateles* y *Ptychocheilus* puedan no ser relacionados como grupos naturales.

I.2 El complejo *robusta* del Río Colorado

Gila robusta Baird y Girard, 1853, del sistema del Río Colorado fue considerada por Jordan y Gilbert (1877) en EUA como la especie tipo del género. Esta especie anteriormente incluía a las subespecies *Gila robusta seminuda*, *Gila. robusta elegans*, *Gila robusta grahami*, sin embargo estas últimas hoy en día son reconocidas como especies nominales (*G. seminuda*, *G. elegans* y *G. nigra* respectivamente, Schönhuth *et al.*, 2014). El complejo *robusta* del Río Colorado está actualmente integrado por *G. robusta*, *G. cypha*, *G. elegans*, *G. intermedia*, *G. nigra*, y *G. seminuda* (Rinne, 1976; Rosenfeld y Wilkinson, 1989; Gerber *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2004; Schönhuth *et al.*, 2014) y su historia taxonómica ha sido muy compleja.

La clasificación taxonómica de las especies de *Gila* en el bajo Río Colorado se encuentra actualmente en debate. Mientras algunos autores consideran que estas se componen de *G. robusta*, *G. nigra* y *G. intermedia* (Minckley y DeMarais, 2000; Nelson *et al.*, 2004; Page *et al.*, 2013), los análisis más recientes indican que no existe evidencia morfológica ni molecular que soporte a estas especies como independientes (Dowling *et al.*, 2015; Copus *et al.*, 2016; Page *et al.*, 2016). Page *et al.* (2016) atribuye que las diferencias morfológicas detectadas por Minckley y DeMarais (2000) pueden deberse a antiguos periodos de aislamiento geográfico y diferenciación con una posterior mezcla de linajes e hibridación. Adicionalmente, Page *et al.* (2016) también considera que las diferencias al interior de *Gila* en el bajo Río Colorado pueden ser respuesta por la plasticidad fenotípica debido a los diferentes hábitats donde se encuentran.

La situación taxonómica y origen de *G. nigra*, una especie con morfología intermedia entre *Gila robusta* y *G. intermedia*, aún se encuentra en discusión (Minckley y DeMarais, 2000; Gerber *et al.*, 2001). El resto de las especies del complejo *robusta* (*G. cypha*, *G. elegans*, y *G. robusta*) poseen una distribución simpátrica con reportes de posible hibridación

entre estos tres taxa (DeMarais *et al.*, 1992; Dowling y DeMarais, 1993; Gerber *et al.*, 2001). A pesar de que en la mayoría de los casos la hibridación puede dificultar la diferenciación de especies, algunos estudios moleculares han mostrado que este evento ha sido un factor importante en la diversificación de *Gila* (Rosenfeld y Wilkinson, 1989; DeMarais *et al.*, 1992; Dowling y DeMarais, 1993; Gerber *et al.*, 2001; Schönhuth *et al.*, 2014).

El posible origen híbrido de algunas especies de *Gila* como *G. seminuda* (*G. robusta* × *G. elegans*) y *G. nigra* (*G. robusta* × *G. intermedia*) fue sugerido debido a las diferencias entre los resultados morfológicos y moleculares obtenidos por varios autores (Rosenfeld y Wilkinson, 1989; DeMarais *et al.*, 1992; Dowling y DeMarais, 1993; Gerber *et al.*, 2001). Los resultados posteriores con ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN nuclear (ADNn) que incluían las seis especies validas del complejo *robusta* del Río Colorado (*G. cypha*, *G. elegans*, *G. intermedia*, *G. nigra*, *G. robusta* y *G. seminuda*) no mostraron evidencia de formar un solo grupo monofilético (Schönhuth *et al.*, 2014). Sin embargo fueron anidadas en tres linajes mitocondriales muy consistentes (Schönhuth *et al.*, 2014). El grupo uno conformado por *G. chypa* – *G. robusta*, el grupo dos, integrado por *G. nigra* – *G. robusta* – *G. intermedia* y el grupo tres integrado por *G. elegans* – *G. seminuda* (Schönhuth *et al.*, 2014). Los análisis mitocondriales y nucleares de Schönhuth *et al.* (2014) nunca dieron apoyo a la monofilia de *G. robusta* y resolvió a este complejo como un grupo parafilético de dos linajes (Grupos uno y dos). De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2014), este patrón de resolución filogenética puede ser el resultado de introgresión entre *G. cypha* y *G. robusta*, como fue sugerido por Rosenfeld y Wilkingson (1989) y Gerber *et al.* (2001) a partir de análisis morfométricos y moleculares. De igual manera la cercana relación entre *G. robusta* con *G. nigra* y *G. intermedia* del grupo dos, puede deberse a una clasificación incompleta del linaje debido a hibridación, como ha sido visto en estudios anteriores (DeMarais *et al.*, 1992; Dowling y DeMarais, 1993; Minckley y DeMarais, 2000). Por otra parte la variación de ADNmt mostró a *G. elegans* y *G. seminuda* como los integrantes del grupo tres, pero la variación en el ADN nuclear propone la hipótesis de *G. seminuda* como una especie parafilética (Schönhuth *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos por Schönhuth *et al.* (2014) pueden sugerir introgresión y/o una clasificación incompleta del linaje, sin embargo son consistentes con los estudios anteriores donde se mostraba a *G. seminuda* como una especie con posible origen híbrido con alelos nucleares de

G. robusta y *G. elegans*, pero con variabilidad mitocondrial solo de *G. elegans* (Rosenfeld y Wilkingson, 1989; DeMarais *et al.* 1992).

A pesar de los estudios encaminados a conocer el origen de las especies de *Gila*, hay una gran falta de conocimiento filogenético de especies ya clasificadas para este género, especialmente para aquellas que se encuentran en México (Simons y Mayden, 1998; Simons *et al.* 2003; Schönhuth *et al.*, 2014). Las relaciones filogenéticas entre las especies de *Gila* son esenciales para entender su historia y distinguir los casos de clasificación incompleta de linajes, además ayudan en la delimitación de especies y evitar conclusiones inadecuadas sobre diversidad (Wiley, 1981; Mayden, 1999, 2002, 2013).

I.3 Las especies del género *Gila* en México

El estudio filogenético realizado por Schönhuth *et al.* (2014) que incluye todos los representantes conocidos dentro del linaje de *Gila* mostró la sistemática y distribución actual para las especies en México. Este trabajo determinó un grupo que ellos clasificaron como “El grupo del Desierto de Chihuahua” que incluye todas las especies nativas de esa región. Este grupo se distribuye en cuencas independientes que se piensa fueron parte del hipotético antiguo sistema del Río Grande/Bravo (Smith y Miller, 1986) que incluía cuencas endorreicas y se extendía al Sur del Río Tunal, con un desagüe que ahora forma parte del Río Mezquital. De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2014) las especies del grupo del Desierto de Chihuahua muestran un patrón de distribución de endemismo en cuencas independientes y en ocasiones en ambas zonas de la línea divisoria continental en Norte América.

El grupo del Desierto de Chihuahua resuelto por Schönhuth *et al.* (2014) incluye los linajes de *G. pulchra*, *G. conspersa*, *G. nigrescens*, *G. brevicauda*, *Gila* sp. y un linaje integrado por *G. modesta* con *G. pandora*. Actualmente estas dos últimas especies son reconocidas como especies válidas por los gobiernos Mexicano y Estadounidense, sin embargo el análisis de Schönhuth *et al.* (2014) a partir de *Cyt-b* no mostró diferenciación genética entre estas dos especies nominales y este resultado fue interpretado como la existencia de diferentes “morfotipos” de la misma especie, especies primitivas o especies con

un linaje incompleto entre ellas. *Gila pandora* y *G. modesta* muestran una distribución alopátrica sin especies de *Gila* entre ellas. *G. pandora* se distribuye en EUA en cuencas del alto Río Grande y el bajo Río Pecos en Texas, Nuevo México y Colorado, mientras que *G. modesta* se encuentra en el Estado de Coahuila en México en el Río San Juan.

El linaje de *G. conspersa* estudiado por Schönhuth *et al.* (2014) mostró distribuirse en los Ríos endorreicos Nazas y Aguanaval en la parte Sur del Desierto de Chihuahua en los estados de Durango y Zacatecas. Adicionalmente, los registros de Schönhuth *et al.* (2014) sugieren ampliar el rango de distribución de esta especie al Río Presidio con desembocadura al Océano Pacífico.

Recientemente el linaje de *G. pulchra* ha sido restringido al Río Conchos (Miller *et al.*, 2006). Mientras que para Norris *et al.* (2003) las poblaciones vecinas en las cabeceras de los ríos Yaqui y Fuerte fueron consideradas “especies similares aun no descritas”. Schönhuth *et al.* (2014) incluye dentro del linaje de *G. pulchra* especímenes ampliamente distribuidos a lo largo del Río Conchos, así como especímenes de las cabeceras del Río Fuerte en Chihuahua. La baja diferenciación genética obtenida para este linaje a través de *Cyt-b* entre los especímenes de ambas regiones de la línea divisoria continental puede haberse debido a la falta de anagénesis de los genes analizados, causas antropogénicas, alelos primitivos compartidos en el grupo, o recientes conexiones en las cabeceras (Schönhuth *et al.*, 2014).

El análisis mitocondrial de Schönhuth *et al.* (2014) resolvió el linaje de *G. nigrescens* con resultados distintos a los obtenidos por marcadores nucleares (Osborne *et al.*, 2012). El bajo grado de diferenciación genética encontrado con *Cyt-b* para este linaje sugirió extender el rango de distribución de *G. nigrescens* e incluir las subcuencas independientes del complejo endorreico de la cuenca del Río Guzmán en Chihuahua en el Norte de México (Río Santa María, Río Casas Grandes, Río Santa Clara), Nuevo México (Río Mimbres), Laguna Bustillos, Laguna Bavicora y el alto Río Papigochi (Sur del Río Yaqui en el Pacífico).

Ambos análisis con genes nucleares y mitocondriales de Schönhuth *et al.* (2014) para *G. brevicauda* fueron satisfactorios en determinar un linaje bien definido para esta especie y se observó muy cercana a *G. pulchra*. *G. brevicauda* es una especie recientemente descrita por

Norris *et al.* (2003) para las cabeceras del Río Mayo. Además de los registros anteriores de esta especie, recientes estudios han descubierto poblaciones dentro del linaje de *G. brevicauda* en los ríos Yaqui y Fuerte (Schönhuth *et al.*, 2014).

El último linaje resuelto para el grupo del Desierto de Chihuahua incluye especímenes referidos por Schönhuth *et al.* (2014) como *Gila* sp. 1. Los miembros de este linaje se distribuyen a lo largo de diferentes cuencas del sistema Tunal-Mezquital en los estados de Zacatecas y Durango. Los análisis con marcadores nucleares y mitocondriales apoyaron a *Gila* sp. 1 como un linaje bien diferenciado y divergente del resto de sus congéneres locales y sugieren considerar estas poblaciones como especies aun no descritas. El escaso grado de diferenciación genética detectado para este linaje pudiera indicar recientes conexiones entre estas cuencas actualmente aisladas, similar a lo reportado por Schönhuth *et al.* (2011) para otro ciprínido de esa región.

Adicionalmente al grupo del Desierto de Chihuahua, el análisis de Schönhuth *et al.* (2014) incluyó a las especies *G. minacae*, *G. eremica* y *G. ditaenia* en cuencas del Noroeste de México con vertiente al Pacífico. A pesar de que estas tres últimas especies se mostraron separadas del grupo del Desierto de Chihuahua, los análisis nucleares y mitocondriales siempre resolvieron a estas tres especies como un grupo con monofilia recíproca dentro de las 21 a 23 especies del linaje de *Gila* dentro del COR.

El linaje de *G. minacae* se encuentra distribuido en los ríos Yaqui, Fuerte y San Lorenzo. Debido a su morfología *Gila minacae* Meek, 1902, era considerada por varios autores (Miller, 1959, 1976; Minckley, 1973; Gilbert, 1998) como una subespecie de *G. robusta* (*G. robusta minacae*) o una sinonimia de *G. robusta*. Posteriormente, *G. minacae* fue restablecido por Norris *et al.* (2003). El análisis de Schönhuth *et al.* (2014) reconoce a *G. minacae* como una de las especies más divergentes dentro del linaje de *Gila*, filogenéticamente muy separada del complejo *robusta* del Río Colorado.

El linaje de *G. ditaenia* fue resuelto por Schönhuth *et al.* (2014) como un grupo monofilético endémico para la cuenca del alto Río de la Concepción en el Estado de Sonora, México. Las relaciones filogenéticas de *G. ditaenia* no fueron consistentes en los tres criterios

utilizados por Schönhuth *et al.* (2014). Sin embargo, el gen mitocondrial *Cyt-b* y el concatenado de los marcadores nucleares con el mitocondrial mostraron al linaje de *G. ditaenia* relacionado con especies del complejo *robusta* del Río Colorado.

El linaje de *G. eremica* fue resuelto por Schönhuth *et al.* (2014) como un grupo monofilético y endémico al Estado de Sonora para las cuencas de los ríos Sonora y Mátape. El análisis por *Cyt-b* indicó una divergencia genética muy baja entre los especímenes de ambas cuencas y los análisis filogenéticos de todos los marcadores utilizados resolvieron a *G. purpurea* como la especie hermana de *G. eremica* como ya ha sido declarado por DeMarais, (1991). Adicionalmente el análisis concatenado de los genes *Rag1*, *Rhod*, *S7* y *Cyt-b* mostró a estas dos últimas especies como un grupo muy cercano a *G. minacae* (Schönhuth *et al.*, 2014).

Los análisis para el género *Gila* indican que sus especies en el Suroeste de EUA aparentemente siguen un patrón de diferenciación distinto al detectado para las especies de *Gila* en México (Jordan y Gilbert, 1877; Schönhuth *et al.*, 2014). Mientras que en el Suroeste de EUA varias especies de *Gila* muestran una distribución principalmente simpátrica con reportes del posible origen híbrido para algunas de ellas (DeMarais *et al.*, 1992; Dowling y DeMarais, 1993; Gerber *et al.*, 2001; Schönhuth *et al.*, 2014; Dowling *et al.*, 2015), las especies de *Gila* de México son en gran parte alopátricas con un patrón de endemismo por cuencas, lo que sugiere un modelo de especiación peripátrico para los *Gila* de esa región (Wiley, 1981; Schönhuth *et al.*, 2014). Sin embargo, las especies de *Gila* en México han sido muy poco estudiadas, por lo que existe una falta de comprensión de la actual diversidad del género en el país.

I.4 Estado actual de *Gila eremica* y nuevos registros de poblaciones aisladas

Debido a su similitud morfológica y distribución geográfica, la carpa del desierto fue inicialmente confundida con su pariente más cercano la carpa Yaqui, *Gila purpurea* descrita para el Arroyo San Bernardino de la subcuenca del Río Bavispe en Arizona EUA (Miller, 1959; Barbour y Miller, 1978). El trabajo de Hendrickson *et al.* (1981) que incluía peces de la cuenca del Río Yaqui en México y EUA detectó diferencias entre las poblaciones de *G.*

purpurea de la cuenca del Río Yaqui con las registradas para las cuencas de los ríos Sonora y Mátape. Sin embargo, no incluía un análisis formal de la variación geográfica de estas poblaciones. A partir de los datos publicados por Hendrickson *et al.* (1981), DeMarais (1991) formuló una hipótesis que colocaba como una especie aun no descrita a las poblaciones de *G. purpurea* para las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y en regiones del Noroeste de la cuenca del Río Yaqui en la subcuenca de los Ríos Nacozari-Moctezuma. El análisis de DeMarais (1991) incluyó seis caracteres merísticos y 26 morfométricos para especímenes de estas tres últimas cuencas y adicionalmente incluyó a *G. ditaenia* de Río de la Concepción en Sonora. Los resultados diagnósticos para las poblaciones de los ríos Sonora y Mátape las clasificaron como una especie endémica para esas cuencas e independiente de *G. purpurea* del Río Yaqui. La nueva especie *Gila eremica* DeMarais, 1991 divergió de *G. purpurea* en varios caracteres morfológicos en los que destacan un pedúnculo caudal menos profundo, una distancia promedio menor del origen de la aleta pectoral al origen de la aleta pélvica y una mandíbula superior más larga. Adicionalmente, *G. eremica* mostró diferencias morfométricas y merísticas respecto a *G. ditaenia*. Los análisis filogenéticos más recientes que incluyen a estas especies han corroborado una relación muy cercana entre *G. eremica* y *G. purpurea* (Schönhuth *et al.*, 2012, 2014). Actualmente *G. eremica* es una especie incluida en el linaje de *Gila* dentro del clado occidental redefinido por Schönhuth *et al.* (2012, 2014) del Oeste de Norteamérica. La carpa del desierto habita regiones áridas del Estado de Sonora con un promedio anual de lluvia muy bajo (Turner y Brown, 1982; DeMarais, 1991).

La distribución alopátrica entre *G. eremica* y *G. purpurea* en el Noroeste de la cuenca del Río Yaqui (DeMarais, 1991; Schönhuth *et al.*, 2014) aparentemente demuestra los cambios que ha sufrido esta región. La ictiofauna del Río Yaqui es la más diversa en el Suroeste de América debido principalmente al aparente intercambio de fauna con las cuencas adyacentes (Hendrickson *et al.*, 1981; Minckley *et al.*, 1986). Además de *G. eremica*, la cuenca del Río Sonora comparte otras especies nativas con la cuenca del Río Yaqui como la carpa aleta larga Mexicana *Agosia* n sp. y el rodapiedras Mexicano *Campostoma ornatum* (ciprínidos) y el guatopote de Sonora *Poeciliopsis occidentalis* y su forma híbrida *P. monacha occidentalis* (Poeciliidos). La ictiofauna de la cuenca del Río Mátape, además de *G. eremica* incluye a *P.*

occidentalis y *P. monacha occidentalis* (Juárez-Romero *et al.*, 1988; Varela-Romero y Hendrickson, 2010).

A pesar de que *G. eremica* es una especie nativa para el Estado de Sonora y sus poblaciones han decaído por alteración de sus hábitats naturales e introducción de especies exóticas (Varela-Romero y Hendrickson, 2010) la carpa del desierto no se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT dentro de las especies protegidas por el gobierno Mexicano (SEMARNAT, 2010), ni en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2016). Recientemente Varela-Romero *et al.* (2001) registró dos nuevas poblaciones de *Gila* cf. *eremica* en hábitats de tanques naturales (pozas) en la subcuenca del Arroyo el Tigre, un tributario del extremo Suroeste de la subcuenca del Río Mátape en los cañones La Balandrona y La Pirinola en la porción Sur de la Sierra el Aguaje, aisladas de las conocidas para los ríos Sonora y Mátape. Los ejemplares de *G. cf. eremica* fueron colectados en ambos cañones en tanques naturales conectados entre sí por un arroyo somero intermitente con fondos de roca y arena con importantes coberturas de vegetación y palmas. Posteriormente Bogan *et al.* (2014) reporta la presencia de estas poblaciones asignándolas a la especie nominal *G. eremica*.

Además de los cañones La Balandrona y La Pirinola, La Sierra El Aguaje presenta otros cañones que mantienen agua permanente entre los que se cuentan el de Nacapule, Las Barajitas y Los Anegados (Aguaje de Robinson), pero no mantienen poblaciones de peces nativos. Todas estas regiones muestran áreas de vegetación tropical rodeada por vegetación desértica, con registros de plantas endémicas, especies tropicales geográficamente aisladas y fauna nativa de interés para la conservación. Los hábitats de estas dos nuevas poblaciones de *Gila* presentan un ecosistema con variables adecuadas para el desarrollo de especies nativas y son áreas ideales para la protección y conservación de este pez, además de representar una invaluable región ecológica del Desierto Sonorense (Búrquez *et al.*, 1999; Felger, 1999; Varela-Romero, 2001; Bogan *et al.*, 2014).

I.5 Análisis morfométricos para caracterizar unidades biológicas

Los estudios clásicos de clasificación taxonómica y biodiversidad se han basado en la descripción de las formas biológicas a partir de la comparación anatómica de los organismos analizados. Debido a lo anterior, los análisis morfométricos han resultado muy útiles en la caracterización de unidades biológicas ya que a partir de ellos es posible evaluar a fina escala las diferencias morfológicas entre organismos y distinguir patrones de variación intraespecífica. Estos análisis se centran en el estudio de la variación de la forma y su covariación respecto a otras variables (Bookstein, 1991; Dryden y Mardia, 1998).

Los análisis morfométricos para la caracterización de unidades biológicas en peces han utilizado los enfoques de morfometría geométrica y morfometría tradicional, también conocida como multivariada (DeMarais, 1991; Corti y Crosetti, 1996; Cavalcanti *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2001; Turan *et al.*, 2004). Los avances en las técnicas de análisis morfométricos han provisto métodos efectivos para evaluar la forma de los organismos para identificar diferencias entre poblaciones, detectar diferencias entre grupos y diferenciar entre especies con morfología similar (Rohlf y Slice, 1990; Rohlf y Marcus, 1993; Mojekwu y Anumudu, 2015).

El enfoque de la morfometría geométrica describe la disposición espacial respecto a las características anatómicas de los organismos (Rohlf y Marcus, 1993; Rohlf, 1999; Caldecutt y Adams, 1998; Adams y Rohlf, 2000; Rüber y Adams, 2001; Adams *et al.*, 2004). A partir de la morfometría geométrica es posible representar cada muestra por las posiciones relativas de los puntos morfológicos de referencia (landmarks) que pueden ser localizados con precisión para establecer uno a uno la correspondencia entre todos los especímenes incluidos en el análisis (Klingenberg, 2010). Los métodos de morfometría geométrica han sido útiles en peces para la caracterización de poblaciones y para detectar diferencias morfológicas entre especies que pueden ser atribuidas a su biología y hábitats de ocupación, con implicaciones en su manejo y conservación (Khataminejad *et al.*, 2013; Ghoghghi *et al.*, 2014; Cicek *et al.*, 2016).

El protocolo de enrejado o box truss es un método derivado del sistema de enrejado de Truss (Truss Network system) (Strauss y Bookstein, 1982). El uso de esta técnica ha sido útil en la determinación de unidades biológicas en peces (Corti *et al.*, 1988; Haddon *et al.*, 1995;

Pakkasmaa y Piironen, 2001; Turan *et al.*, 2004; Merz *et al.*, 2014; Wiadnya *et al.*, 2015). A partir del sistema de la red de Truss mediante marcas de referencia es posible cubrir la forma completa del pez en una red uniforme de medidas lineales y tener una mayor cantidad de datos que posibilitan detectar diferencias morfométricas intra e inter específicas (Turan, 1999).

La aplicación de análisis morfométricos requiere distintas técnicas de estadística multivariada. Algunos de estas técnicas consideran la muestra total analizada como un grupo único, sin embargo existen otros enfoques donde la muestra total es separada en distintos grupos previamente definidos. Los primeros análisis resultan útiles para detectar subdivisiones en la población total, mientras que los otros ayudan en comprobar la estructura de la población total en los grupos anteriormente definidos (Turan, 1999).

Los análisis que consideran la muestra total como un grupo único son básicamente exploratorios y no verifican una hipótesis estadística, por lo general se utilizan los análisis de componentes principales (ACP) y de agrupamiento jerárquico o análisis de Clusters. El ACP (Pearson, 1901; Hotelling, 1933) combina y sintetiza la variación asociada de cada una de las variables medidas en un número menor de componentes principales (CP), considerados como la combinación lineal de las variables que describen las variaciones de la forma en la muestra total en un único grupo (Turan, 1999). Las correlaciones entre las variables originales y los componentes principales pueden utilizarse para interpretar la importancia de las variables individuales en la descripción de la variación del conjunto de datos. Cada componente principal obtenido en el análisis indica el porcentaje de variación total de todas las variables analizadas (Turan, 1999).

Los análisis donde la muestra total es separada en distintos grupos previamente definidos contrastan ésta hipótesis y resuelve en niveles de significancia con los que se logra verificar o rechazar las diferencias de conformación promedio entre los grupos analizados (Turan, 1999). Un método utilizado en los análisis morfométricos es el análisis de función discriminante (AFD) también conocido como análisis variado canónico (Fisher, 1936). Este análisis incluye en una sola prueba los análisis de componentes principales, análisis multivariado de varianzas (MANOVA) y el cálculo de función discriminante. A partir del AFD es posible verificar la igualdad de las medias de las variables y ordenar a los grupos en

gráficas de dispersión, respecto a la mayor separación posible entre ellos. Las distancias de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936) obtenidas por el AFD señalan la separación que posee cada individuo analizado respecto a los centroides de cada grupo. La distancia discriminante se asocia a la probabilidad de pertenecer a un grupo y esta distancia posee un valor taxonómico. Si los grupos se encuentran natural y correctamente definidos, la probabilidad de reclasificación en el grupo será alta. Adicionalmente el AFD genera funciones discriminantes que permiten *a posteriori* clasificar un individuo de un grupo desconocido en su grupo más probable. A partir del AFD se obtienen las variables morfométricas y merísticas que discriminan más efectivamente entre los distintos grupos analizados.

Ambos métodos multivariados de componentes principales y función discriminante pueden generar gráficos para visualizar las relaciones entre los individuos de grupos a partir del trazado de los centroides de las primeras dos funciones canónicas y componentes principales de las poblaciones. Las mediciones con altas cargas en análisis canónicos representan la diversidad entre las muestras y difieren del ACP ya que este último analiza la diversidad total. Cada componente principal posee el porcentaje de varianza total de todas las variables, pero en el análisis canónico, cada función posee el porcentaje de la variabilidad total entre grupos. Debido a esto el análisis canónico resulta útil para describir el patrón de diferenciación fenotípica entre las poblaciones analizadas (Turan, 1999).

Los métodos morfométricos han sido utilizados dentro del género *Gila* por DeMarais (1991) para diferenciar a la carpa del desierto *G. eremica* de su pariente más cercano la carpa Yaqui *G. purpurea* y adicionalmente en el análisis incluyó a *G. ditaenia*. Los resultados mostraron diferencias para *G. eremica* y *G. purpurea* en el tamaño de la boca, la distancia entre los orígenes de las aletas pélvica y pectoral y el grosor del pedúnculo caudal. Ambas especies son alopátricas en la cuenca del Río Yaqui y *G. eremica* resultó diferir tanto merística como morfológicamente de *G. ditaenia* del cercano Río de la Concepción (DeMarais, 1991).

Otro estudio relacionado utilizó caracteres morfológicos y alozimas dentro de *Gila* para analizar el posible origen híbrido de *G. seminuda* del Río Virgin (DeMarais *et al.*, 1992). Los resultados de ambos análisis apoyaron la hipótesis de una introgresión híbrida que dio lugar al reconocimiento de esta especie y se sugirió que este tipo de evento podría haber sido parte del

origen de otras especies del mismo género. Adicionalmente mediante estos análisis ha sido posible diferenciar poblaciones de *G. cypha* y *G. robusta* del alto Río Colorado. El análisis de la deformación relativa separó las ubicaciones simpátricas, excepto para dos poblaciones donde la forma del cuerpo de ambas especies convergió (Douglas *et al.*, 2001). Según este análisis, la variación de la forma de ambas especies resultó ser clinal. Aunque los análisis de morfometría geométrica de las poblaciones fueron estadísticamente similares a los basados en distancias derivadas de un análisis de Truss, el enfoque geométrico demostró visualmente las diferencias fenotípicas entre las poblaciones y especies, lo que resultó en implicaciones para su manejo (Douglas *et al.*, 2001).

Los análisis morfométricos y merísticos han ayudado en la descripción de *Notropis calabazas*, un nuevo miembro para el complejo *Notropis calientis* del centro de México. Los resultados para la nueva especie mostraron que se distingue de los demás miembros del complejo por poseer un mayor número de branquiespinas en el primero y segundo arco branquial, un mayor número de escamas en la línea lateral, más escamas con poros en la línea lateral, más hileras de escamas en la circunferencia del cuerpo y un mayor número de hileras de escamas en la circunferencia del pedúnculo caudal. Adicionalmente el análisis determinó a la nueva especie como poco común dentro de su rango de distribución (Lyons y Mercado-Silva, 2004).

Por otro parte, los análisis morfométricos han sido utilizado en conjunto con los análisis moleculares de alozimas y marcadores mitocondriales dentro de la familia Cyprinidae en la descripción de nuevas especies y poblaciones, lo que también ha apoyado para esclarecer sus relaciones filogenéticas (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2007; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2009).

I.6. El Código de barras del ADN

La confiable identificación de especies y el seguimiento de la detección de la biodiversidad para la conservación de entidades biológicas, ha sido un reto desde años atrás para la ciencia. El acelerado aumento en la extinción de especies, así como la gran cantidad de biodiversidad

desconocida, requiere métodos exactos y eficaces para la delimitación de especies. Una adecuada identificación de organismos basada en caracteres morfológicos generalmente resulta un trabajo difícil que requiere extensos conocimientos taxonómicos. Debido a la reciente disminución de expertos en esa última área y el gran número de especies actualmente reconocidas, las herramientas moleculares se han convertido en una base para los análisis taxonómicos modernos.

Los sistemas de identificación a partir de segmentos cortos de ADN que permiten la discriminación de unidades biológicas representan uno de los enfoques más prometedores para el diagnóstico de la biodiversidad. Uno de los primeros trabajos en emplear este tipo de técnicas fue realizado por Nanney (1982) para discriminar especies microbianas. Subsecuentemente este enfoque fue probado en diferentes taxa (McAndrew y Majumdar, 1983; Anderson *et al.*, 1985).

El término código de barras del ADN fue inicialmente empleado por Arnot *et al.* (1993) donde describió la posibilidad de discriminar cepas de *Plasmodium falciparum* a partir de un gen circunsporozoite. Posteriormente se realizaron más trabajos a partir de diferentes marcadores moleculares para la discriminación de especies a partir de segmentos cortos de ADN (Eggert *et al.*, 2002; Floyd *et al.*, 2002).

Hebert *et al.* (2003a, b) fueron más allá de los estudios anteriores y propusieron una región del gen mitocondrial *COXI* como un único locus para el código de barras del ADN para la identificación de especies animales. El sistema del código de barras del ADN propuesto por Hebert *et al.* (2003a, b) prometía una mayor resolución taxonómica que las obtenidas a partir de estudios morfológicos y una solución parcial al decremento del conocimiento taxonómico. El código de barras del ADN fue propuesto como una herramienta para no sólo identificar especies, sino que también para definir límites entre ellas y delimitarlas (Hebert *et al.* 2003a).

De esta forma, el enfoque del código de barras del ADN a través del gen *COXI* empezó a ser utilizado para la identificación y descubrimiento de varias especies animales, ya sean vertebrados e invertebrados (Hajibabaei *et al.*, 2006a, b; Hebert *et al.*, 2004; Waugh, 2007; Hajibabaei, 2012; Hernández-Dávila *et al.*, 2012) donde los peces son uno de los grupos más

estudiados (Ward *et al.*, 2005; April *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2011; Ward, 2012). Una gran cantidad de peces dulceacuícolas y marinos han sido analizados bajo el enfoque del código de barras del ADN (Carvalho *et al.*, 2011; Mabragana *et al.*, 2011; De Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2012) y este tipo de estudios han ayudado en resolver casos de especies crípticas (Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011).

A pesar de que el código de barras del gen *COXI* propuesto por Hebert *et al.* (2003a, b) ha mostrado gran utilidad en varios grupos de animales (Hebert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*, 2006a, b; Ward *et al.*, 2005; Waugh, 2007; Hubert *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2011; Hajibabaei, 2012; Hernández-Dávila *et al.*, 2012), aún no ha sido posible identificar una región o un solo gen universal para la identificación de todos los taxa. Las propiedades propuestas para un código de barras universal indican que el segmento de ADN debe ser muy similar entre organismos de la misma especie pero diferente entre especies. Adicionalmente, el mismo segmento de ADN debe poder ser utilizado para diferentes grupos taxonómicos y el marcador debe ser robusto con sitios de unión conservados para la amplificación por oligonucleótidos y una sencilla amplificación y secuenciación (Fišer-Pečnikar y Buzan, 2013).

Adicionalmente a la problemática de la falta de un código de barras universal, existen críticas respecto a los métodos de distancias genéticas utilizados en varios de los trabajos que implican al código de barras del ADN (DeSalle *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2007). Hebert *et al.* (2003a, b) propusieron el uso de este tipo de distancias como un método estándar para el análisis de datos del código de barras. El uso de distancias genéticas se basa en la suposición de que las divergencias intraespecíficas deben ser menores que las intrerespecíficas y en la idea de un umbral de divergencia conocido como la brecha del código de barras (barcoding gap) (Meyer y Paulay, 2005). Sin embargo esta brecha del código de barras ha sido puesta en duda por varios autores (Meyer y Paulay, 2005; Gompert *et al.*, 2006; Wiemers y Fiedler, 2007). Además se ha observado que los valores de divergencia a nivel especie pueden llegar a ser bastante arbitrarios (DeSalle *et al.*, 2005; Vogler, 2006), sin embargo Puillandre *et al.* (2012) mostró un intento de superar ese problema.

A pesar del gran uso de los métodos de distancias genéticas en los análisis del código de barras del ADN, las críticas sugieren que estos no deben ser utilizados en todos los estudios,

ya que resulta una medida fenética incompatible con los diagnósticos a partir de técnicas basadas en caracteres por los taxónomos tradicionales (DeSalle *et al.*, 2005). Recientemente, se ha observado que los métodos basados en caracteres pueden ser utilizados alternativamente para identificar reglas de clasificación basadas en una previa organización jerárquica y así rápidamente clasificar nuevos datos sin necesidad de métodos basados en distancias genéticas ni enfoques filogenéticos intensivos (Kelly *et al.*, 2007; Rach *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2009; Lowenstein *et al.*, 2009). Los esquemas a partir de análisis basados en caracteres, poseen una mayor analogía a la idea de un código de barras que los métodos basados en distancias. Recientemente Sarkar *et al.* (2008) desarrollaron el software CAOS (Characteristic Attributes Organization System, por sus siglas en inglés) con el fin de facilitar los análisis de código de barras del ADN basados en caracteres. De acuerdo con Sarkar *et al.* (2008) el desarrollo de un enfoque válido basado en caracteres a través de la herramienta CAOS se divide en dos pasos. Primeramente se requiere establecer un código de barras del ADN. Este aspecto generalmente se refiere al proceso de “identificación de especies” que involucra la identificación de caracteres que son diagnósticos para unidades taxonómicas previamente clasificadas. Este paso es igual al equívoco descubrimiento de caracteres morfológicos diagnósticos en la taxonomía clásica. Una vez que el código de barras basado en caracteres (polimorfismos de nucleótidos) ha sido establecido, un “lector” de código de barras requiere clasificar a la especie de consulta basándose en el “código de barras diagnóstico” identificado. En el caso de los métodos de distancia o árboles, el código de barras del ADN es equivalente a toda la secuencia de ADN y el lector del código de barras considera la posición de la secuencia de consulta en un árbol filogenético. Contrario a lo anterior, el enfoque basado en caracteres considera solamente los sitios diagnósticos (polimorfismos) y el lector del código de barras considera el número de posiciones diagnósticas (sinapomorfias) que se muestran relevantes para apoyar una clasificación en particular. De esta manera el software CAOS primeramente identifica cambios diagnósticos en secuencias de ADN de un conjunto de datos y establece estos cambios como “reglas” para la segunda función del programa que puede leer secuencias de ADN de especímenes de consulta e identifica a estas últimas para sus especies correspondientes (Sarkar *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, el análisis del código de barras mediante CAOS se basa en el enfoque taxonómico clásico donde la discriminación de taxa se realiza partir de atributos característicos únicos para un grupo determinado que están ausentes de otros grupos relacionados (Rach *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Jörger y Schrödl, 2013). El enfoque del código de barras a partir de diagnósticos basados en caracteres resulta un método bastante apropiado ya que el objetivo del código de barras del ADN no es construir árboles filogenéticos, más bien es buscar una rápida y precisa identificación de especies no identificadas a partir de material de referencia previamente verificado (Rach *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Erickson y Kress, 2012; Jörger y Schrödl, 2013).

I.7. Análisis de genética de poblaciones y análisis filogenéticos en peces

La variación de genes mitocondriales ha sido utilizada en diferentes órdenes de peces para conocer el estatus de sus poblaciones como Acipenceriformes (Fontana *et al.*, 2007), Squaliformes (Murray *et al.*, 2008), Cypriniformes (Li *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009), Salmoniformes (Van Houdt *et al.*, 2005; Oleinik *et al.*, 2007; Bouza *et al.*, 2008). El ADNmt es una molécula de herencia materna y evoluciona de 5 a 10 veces más rápido que los genes nucleares y adicionalmente su capacidad de acumular variabilidad genética dentro y entre poblaciones en cortos periodos de tiempo evolutivo lo convierten en un marcador molecular muy efectivo (Avise, 1994).

Uno de los marcadores mitocondriales más empleados en análisis filogenéticos en peces es el gen *Cyt-b*. La utilidad de esta molécula aparentemente resulta del modelo de replicación asimétrica del genoma mitocondrial (Kocher *et al.*, 1989) lo que proporciona un nivel de variación media que le permite describir las relaciones filogenéticas de casi la totalidad del grupo de peces óseos a nivel género y familia (Lydeard y Roe, 1997; Hardman y Page, 2003).

El análisis molecular de Zardoya y Doadrio (1998) a partir de *Cyt-b* determinó las relaciones filogenéticas de todos los ciprínidos endémicos de la Península Ibérica que incluían especímenes del centro de Europa, Asia y África. El resultado de su trabajo agrupó a los ciprinidos ibéricos en cinco linajes de géneros muy diversos, resultado de aislamiento

histórico de la Península Ibérica. Adicionalmente, las relaciones filogenéticas entre los principales linajes detectados apoyaron la hipótesis de la tradicional división de la familia Cyprinidae en las subfamilias Cyprininae y Leuciscinae (Cavender y Coburn, 1992).

Los recientes análisis filogenéticos para ciprínidos de Norteamérica mediante el gen mitocondrial *Cyt-b* y los genes nucleares *Rag1*, *Rhod* y *S7* (Schönhuth *et al.*, 2012) revelaron las relaciones filogenéticas de 71 especies. Los resultados de este último estudio resolvieron un clado occidental muy definido que poseía un menor número de integrantes que el clado occidental originalmente propuesto por Coburn y Cavender (1992). Sin embargo, las especies no incluidas en el clado occidental redefinido por Schönhuth *et al.* (2012) se mostraron anidadas en al menos uno de los clados “Open Posterior Myodome” (OPM) (Mayden, 1989) o Pikeminnow (Simons *et al.*, 2003), lo que provocó una redefinición de la sistemática y filogenia del orden Cypriniformes.

Los análisis filogenéticos y filogeográficos mediante *Cyt-b* y dos marcadores nucleares para *Codoma* en el Noroeste de México resolvieron sus relaciones evolutivas (Schönhuth *et al.*, 2015) y determinaron que el género no es monotípico como se había considerado anteriormente (Miller, 1976; Miller *et al.*, 2006). Adicionalmente, el análisis anidó al género *Tampichthys* como el grupo hermano de *Codoma* y determinó a estos dos géneros como más alejados de *Cyprinella*, *Notropis* y *Pimephales*. La presencia de cuatro linajes al interior de *Codoma* fue atribuida a un largo periodo de aislamiento entre sus poblaciones que fue provocado por la fragmentación del hipotético ancestral sistema del Río Grande (Smith *et al.*, 1986) que se extendía del Sur de EUA hasta el centro de México.

Además de inferir relaciones filogenéticas y biogeográficas entre diferentes especies, el gen *Cyt-b* ha sido útil en determinar relaciones intraespecíficas. El trabajo de Johnson y Jordan (2000) para *Lepidomeda* [*Snyderichthys*] *copei* determinó la divergencia genética entre diez poblaciones de la especie que representaban toda su distribución geográfica conocida (cuencas de la Laguna Bonneville y alto Río Snake en Norteamérica). Sus resultados detectaron dos clados evolutivamente distintos, aislados geográficamente y se reveló que la fragmentación geográfica ha jugado un papel importante en generar estructura genética entre los clados detectados.

Los genes mitocondriales no sólo son útiles en análisis filogenéticos, adicionalmente han sido empleados para determinar la estructura genética poblacional de varias especies animales (Luhariya *et al.*, 2012). La asignación de unidades biológicas a través de marcadores moleculares se basa en la hipótesis de que una unidad se encuentra aislada reproductivamente de otras por lo menos parcialmente, por lo que las diferencias genéticas entre ellas se acumulan por diversos procesos naturales como la deriva génica, la selección natural y el flujo genético restringido, todos estos procesos influenciados por componentes bióticos y abióticos. Las diferencias genéticas acumuladas hacen de cada unidad biológica un componente importante en la evolución de la especie (Nielsen y Powers, 1995).

La región control (RC) del ADN mitocondrial y el gen *Cyt-b* se han usado en conjunto para detectar variación genética. El análisis de Alves *et al.* (2001) a partir de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) en estos marcadores mitocondriales para el ciprínido jarabugo, *Anaecypris hispánica*, una especie altamente amenazada y endémica de la cuenca del Río Guadiana en la península Ibérica mostró que los ejemplares de varios tributarios de la cuenca exhibieron haplotipos en una gran cantidad de sitios polimórficos que podrían indicar un cuello de botella en la población, lo que pudo causar la extinción estocástica de haplotipos. En contraste, las poblaciones de otros ríos tributarios de esta misma cuenca mostraron bajos niveles de diversidad nucleotídica, que aunado a la alta diversidad haplotípica, puede de igual manera indicar eventos genéticos de cuello de botella con subsecuentes expansión de la población. Los análisis moleculares para todas estas poblaciones revelaron estructura geográfica con un limitado o incluso nulo nivel de flujo de genes entre ellas. Adicionalmente, los resultados detectaron poblaciones que se sugiere sean manejadas como unidades evolutivas significativas (UES) y unidades de manejo (UM).

En otros estudios relacionados, un análisis de las poblaciones silvestres de otro ciprínido, el rohu, *Labeo rohita*, en nueve ríos en la India mostró la utilidad de una secuencia parcial de *Cyt-b* para determinar divergencia genética intraespecífica y discriminar stocks genéticos en poblaciones silvestres. La diferenciación para los 35 haplotipos encontrados fue apoyada por el análisis molecular de varianza (AMOVA) que mostró ser significativo para

estructura genética así como el valor de 0.158 ($P < 0.05$) de *Fst* obtenido. Los resultados implica generar estrategias de manejo para la especie (Luhariya *et al.*, 2012).

La *RC* también ha sido usada en conjunto con genes mitocondriales como *ND2*. Echelle *et al.* (2000) realizaron un estudio de la variación genética del pez cachorrillo del desierto *Cyprinodon macularius* para una población en cautiverio y 11 poblaciones silvestres de todo el área de su distribución natural. Los análisis moleculares detectaron 18 haplotipos a partir de un segmento parcial de la *RC* y dos segmentos del gen *ND2*. Los resultados filogenéticos mostraron una relación monofilética entre poblaciones de dos regiones generales, Río Sonoyta/Quitobaquito y Salton Sea/Delta del Río Colorado. Los datos obtenidos por Echelle *et al.* (2000), además de observaciones previas de morfología, patrones de coloración e historia geológica, apoyaron el reconocimiento de las poblaciones del Río Sonoyta/Quitobaquito como *Cyprinodon eremus*, una especie independiente del pez cachorrillo del desierto *C. macularius* del Salton Sea y el Delta del Río Colorado. La alta diversidad encontrada para el ADNmt entre las poblaciones fue atribuida a diferencias entre las dos especies. Los análisis moleculares para *C. macularius* del Salton Sea y las de la Delta del Río Colorado mostraron una porción pequeña pero estadísticamente significativa de la diversidad del ADNmt de la especie. Este resultado, aunado a la historia de conexiones entre estas dos regiones, sugirió el manejo independiente de las dos poblaciones. A pesar de que las poblaciones *C. eremus* del Río Sonoyta y Quitobaquito Springs no fueron significativamente diferentes, la historia de aislamiento entre ellas y la evidencia de divergencia morfológica indicaron la necesidad de un manejo independiente de las formas.

En otro estudio relacionado con *ND2*, se llevó a cabo un análisis para *Cyprinella caerulea*, una especie endémica de la cuenca del Río Mobile en el Sur de EUA y considerada bajo amenaza debido a la reducción de sus poblaciones. Los resultados de sus análisis de variabilidad genética, relaciones filogenéticas y la presencia de un haplotipo común compartido en tres de las cuatro poblaciones actualmente presentes sugirieron que la pérdida de conectividad entre sus poblaciones ha sido reciente, sin embargo ha sido suficiente para provocar diferenciación genética entre ellas (George *et al.*, 2008).

II. HIPÓTESIS

Las poblaciones de la carpa del desierto *Gila eremica* DeMarais, 1991 que habitan las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre revelarán su identidad específica por medio su caracterización morfométrica y la variación de sus genes mitocondriales *Cyt-b*, *COXI* y *ND2*.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Determinar la identidad específica de las poblaciones de la carpa del desierto *Gila eremica* DeMarais, 1991 en Sonora a partir de análisis morfométricos y moleculares.

III.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar morfométricamente las poblaciones de *Gila* cf. *eremica* de la subcuenca del Arroyo el Tigre y de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape.
2. Analizar las relaciones filogenéticas y el tiempo de divergencia de las poblaciones de *G. eremica* estudiadas a partir del gen mitocondrial *Cyt-b*.
3. Reconocer la identidad específica de las poblaciones de *G. eremica* a partir del código de barras del ADN con el gen mitocondrial *COXI*.
4. Determinar la variabilidad genética de las poblaciones de *G. eremica* a partir del gen *ND2*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Recolecta de ejemplares

Los ejemplares de *Gila* fueron obtenidos en sus hábitats naturales bajo los permisos de recolecta DGOPA.03947.250406.1606 y SGPA/DGVS/00505/10. La recolecta se realizó mediante electropesca Coffelt BP – 6 en cada localidad realizando transectos de aproximadamente 100 a 200 m por arroyo muestreado. Para el caso de *G. cf. eremica* sus ejemplares fueron recolectados en estanques naturales utilizando chinchorro playero de 3 mm de luz de malla. Se tomaron muestras de tejido en vivo de las aletas pélvica y pectoral derecha para cada ejemplar recolectado y fueron etiquetadas individualmente con el número y sitio de recolecta. Se registraron las coordenadas geográficas de los sitios de recolecta, así como su descripción gráfica. Las muestras de tejido de cada ejemplar se colocaron en tubos Eppendorf debidamente etiquetadas con etanol absoluto. Las muestras de tejido fueron transportadas al laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS y depositadas en la colección de tejidos en refrigeración a -20° C. El resto de los especímenes recolectados fueron fijados en formaldehído al 10% y posteriormente transferidos a etanol al 50% para preservarlos y depositarlos en la colección de peces nativos del DICTUS como ejemplares de referencia.

IV.2. Caracterización morfométrica.

El análisis morfométrico incluyó ejemplares del linaje de *Gila eremica* de las subcuencas de los ríos Sonora y San Miguel en la cuenca del Río Sonora, la subcuenca del Río Mátape en la cuenca del Río Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre en los cañones La Balandrona y La Pirinola (Tabla1, Figura 1). Adicionalmente se incluyeron ejemplares de *G. ditaenia* de las subcuencas de los ríos Altar y Magdalena en la cuenca del Río De la Concepción, *G. purpurea* del Arroyo San Bernardino en el alto Río Yaqui y *G. minacae* del Arroyo El Largo en la subcuenca del Río Bavispe. La caracterización morfométrica también incluyó ejemplares de

Gila eremica asignados como paratipos y ejemplares de *G. purpurea* utilizados por DeMarais (1991) para la descripción formal de *G. eremica* (Tabla 1, Figura 1).

Tabla 1. Lista de las localidades de recolecta para los ejemplares de *Gila* utilizados en este estudio para análisis morfométricos y moleculares. USON = Universidad de Sonora, Hermosillo; MNCN = Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España; UAIC = University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama, EUA; BYU = Brigham Young University, Provo, Utah, EUA. N/A indica que los organismos no fueron utilizados para análisis morfológico.

Taxón	Localidad	Número de catálogo	Nº de organismos analizados (morfometría)
<i>G. eremica</i>	1.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río Bacanuchi, Río Bacanuchi en el vado de Tahuichopa, 5 km N de Arizpe, Sonora. 30°21'31.85''N, 110°6'21.63''O	USON-0247	4
	30°21'59.66''N, 110°09'24.52''O	USON-1301	16
	2.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río Bacanuchi, Río Bacanuchi al S de bacanuchi al cruce con el camino a Arizpe, Sonora. 30° 34' 32.916"N, 110° 13' 14.952"O	USON-1310	N/A
	3.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río Bacoachi, Arroyo Chinapa en el vado entre la carretera a Arizpe, Sonora. 30°55'55.06"N, 110° 2'31.13"O	USON-1323	N/A
	4.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río Bacoachi, en el Cañón de Miller, Sonora. 31°0'1.65''N, 110°2'15.27''O	ASU-9036	10
	5.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río Sonora, Río Sonora en El Cahui a 1 km de La Labor, Sonora. 29°36'23.65''N, 110° 7'29.57''O	MNCN-279686	N/A
	6.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río San Miguel, Río San Miguel en Rayón, Sonora. 29°42'45.62''N, 110°34'43.41''O	USON-0318	10
	7.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río San Miguel, Arroyo Saracachi 8 km al N de Agua Fría, Sonora. 30°21'32.66''N, 110°36'2.11''W	USON-0297	10

	8.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río San Miguel, Río San Miguel al N de Cucurpe, Sonora. 30°20'26.59''N, 110°41'37.09''W	USON-1304	N/A
	9.- Cuenca del Río Sonora, subcuenca Río San Miguel, Río San Miguel en el Cajón de la Brisca, Sonora. 30°23'39''N, 110°33'38''O	ASU-11052	10
	10.- Cuenca del Río Mátape, subcuenca Río Mátape, Río Mátape en Mesa Quemada, Mazatán, Sonora 29°59'56.04''N, 100°8'51.25''O	USON-0017	5
	29°59'56.04''N, 100°8'51.25''O	USON-0120	8
	29°59'56.04''N, 100°8'51.25''O	USON-0118	7
	29°59'56.04''N, 100°8'51.25''O	ASU-11052	10
	11.- Cuenca del Río Mátape, subcuenca Río Mátape, Río Mátape al O de San José de Pimas, carretera 16, Sonora. 28°43'7.82''N, 110°20'53.43''O	UAIC-15296	N/A
<i>G. cf. eremica</i>	12.- Cuenca del Río Mátape, subcuenca Arroyo El Tigre, Cañón La Balandrona, Sierra el Aguaje, Sonora. 28°02'38.04''N, 111°04'2198''O	USON-1300	30
	13.- Cuenca del Río Mátape, subcuenca Arroyo El Tigre, Cañón La Pirinola, Sierra el Aguaje, Sonora. 28°05'32''N, 111°02'15''O	USON-1006	11
	28°04'58''N, 111°02'47.4''O	USON-1121	2
	28°03'52.9''N, 111°02'54.7''O	USON-1302	17
<i>G. purpurea</i>	14.- Cuenca del Río Yaqui, subcuenca Río Bavispe, Arroyo San Bernardino en la frontera entre Sonora y Arizona. 31°19'57.37''N, 109°15'35.17''O	USON-0766	15
	Captive stock, Dexter National Fish Hatchery.	ASU-11555	15
<i>G. ditaenia</i>	15.- Cuenca Río de la Concepción, subcuenca Río Magdalena, Río Magdalena 8.8 km al S de Magdalena de Kino, Sonora. 30°35'27.89''N, 111°3'30.77''O	USON-0095	7
	16.- Cuenca Río De la Concepción, subcuenca Río Magdalena, Río Magdalena en la carretera que cruza hacia San Ignacio-Terrenate, Sonora. 30°41'50.7''N, 110°55'39.5''O	USON-1377-1	N/A

	17.- Cuenca Río De la Concepción, subcuenca Río Altar, Arroyo Agua Caliente en la carretera de Saric a Nogales, Sonora. 31°9'30.75''N, 111°21'13.39''O	USON-0080	
<i>G. minacae</i>	18.- Cuenca del Río Yaqui subcuenca Río Bavispe, Arroyo El Largo 2.5 km al E del Ejido Arroyo El Largo, Sonora. 29°44'3.9''N, 108°36'48.6''O	USON-1224	20

El análisis morfométrico se desarrolló a partir de 33 distancias lineales basadas en el protocolo de box-truss (Bookstein *et al.*, 1985) y seis caracteres merísticos (Hubbs y Lagler, 1958) (Figura 2, Tabla 2). Cada ejemplar examinado fue medido con un vernier digital (precisión 0.01 mm) conectado a una computadora personal. Las medidas morfométricas de cada ejemplar fueron estandarizadas por la regresión de Elliot *et al.* (1995) con el objetivo de homogenizar sus varianzas (Jolicoeur, 1963) y remover el efecto de alometría en la talla del pez. La regresión de Elliot fue calculada para cada carácter medido por la ecuación:

$$Ms = Mo \left(\frac{Ls}{Lt} \right)^b$$

Donde Ms = medida estandarizada del carácter, Mo = medida original del carácter (mm), Ls = promedio de la longitud estándar de cada carácter medido de cada ejemplar (mm), Lt = Longitud estándar (mm) de cada ejemplar y “ b ” fue calculado para cada carácter por la ecuación no lineal, $M = aL^b$. El parámetro “ b ” fue estimado como la pendiente de la regresión $\text{Log}Mo$ sobre $\text{Log} Lt$ a partir de cada individuo.

Los datos morfométricos estandarizados y valores merísticos para todos los ejemplares fueron analizados entre poblaciones de subcuencas por medio de un análisis de función discriminante (AFD) paso a paso hacia adelante con el software STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc., Tulsa), con el fin de detectar que combinación de caracteres discrimina mejor entre los grupos analizados.

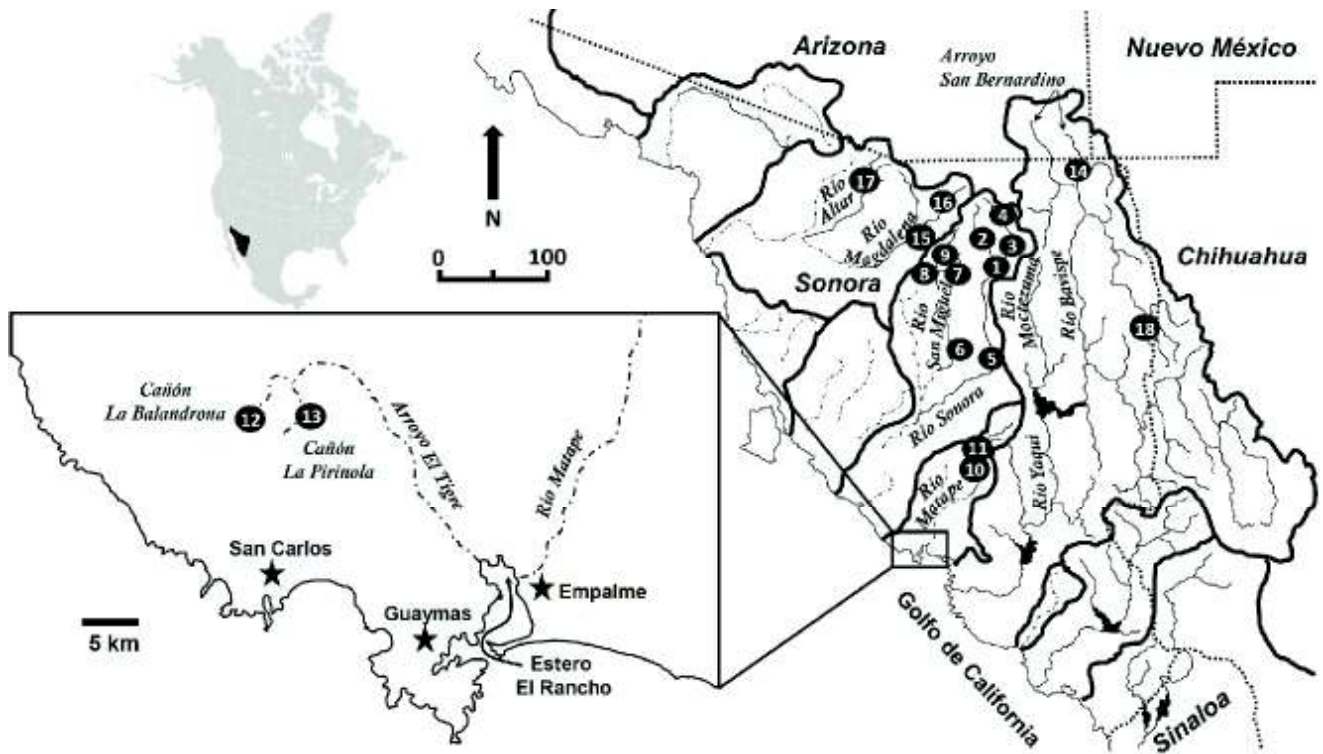


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de recolecta para los ejemplares de *Gila* analizados en el presente estudio. Los números en los círculos negros representan las localidades que están detalladas en la Tabla 1. Las divisiones hidrográficas son representadas por líneas gruesas. Las líneas discontinuas indican cursos de drenaje intermitentes. Las estrellas indican centros urbanos.

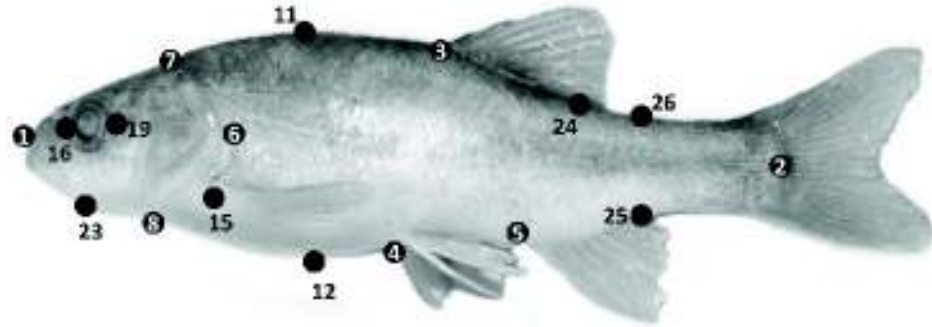


Figura 2. Marcas de referencia para el protocolo de box-truss utilizadas en especímenes de *Gila* analizados. Ver la Tabla 2 para explicación de los códigos de las mediciones. El espécimen de la imagen representa a *Gila* cf. *eremica*.

Tabla 2. Medidas lineales (distancias) basadas en el protocolo de box-truss y caracteres merísticos cuantificados para las poblaciones de *Gila* spp. en Sonora, México. En la Figura 2 se observan los números de los códigos para marcas de referencia. M = medida.

Código	Carácter morfométrico
M1-2	Longitud estándar
M1-3	Longitud predorsal
M1-4	Longitud prepélvica
M2-5	Origen de la aleta anal a la placa hipural
M1-6	Longitud de la cabeza
M1-7	Longitud media dorsal de la cabeza
M7-8	Profundidad de la cabeza
M9-10	Anchura de la cabeza
M11-12	Profundidad del cuerpo
M13-14	Anchura del cuerpo
M4-15	Origen de la aleta pectoral al origen de la aleta pélvica
M-16	Longitud del hocico
M-17	Longitud del hocico al istmo
M-18	Longitud de la barbilla al istmo
M-19	Diámetro del ojo
M-20	Longitud postorbital
M-21	Ancho interorbital carnososo
M-22	Longitud de la mandíbula superior
M-23	Ancho de la boca
M5-24	Longitud del pedúnculo caudal
M25-26	Profundidad del pedúnculo caudal
M-27	Longitud de la aleta pélvica
M-28	Longitud de la aleta dorsal
M-29	Longitud de la aleta anal
M-30	Longitud de la aleta pectoral
M-31	Longitud de la aleta caudal

M3-15	Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta pectoral
M3-4	Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta pélvica
M3-5	Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta anal
M3-25	Origen de la aleta dorsal a la base del último radio en la aleta anal
M3-2	Origen de la aleta dorsal a la placa hipural
M4-5	Origen de la aleta pélvica al origen de la aleta anal
M15-19	Origen de la aleta pectoral al margen posterior de la órbita
Carácter merístico	
1.-	Numero de branquiespinas
2.-	Radios de la aleta dorsal
3.-	Radios de la aleta anal
4.-	Radios de la aleta pectoral
5.-	Radios de la aleta pélvica izquierda
6.-	Escamas en la línea lateral

IV.3. Extracción de ADN y amplificación por PCR de los genes *Cyt-b*, *ND2* y *COXI*

El ADN total de los ejemplares recolectados fue obtenido de acuerdo con los protocolos del Kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen total de 50 µl mediante la solución GoTaq Colorless Master Mix (Promega). El gen mitocondrial *Cyt-b* fue totalmente amplificado (1,140 pb) con los oligonucleótidos FW-L15058 5'-TGA CTT GAA AAM CCA CCG TTG-3' y RV: H16249 5'-TCA GTC TCC GGT TTA CAA GAC-3' reportados por Kocher *et al.* (1989). La secuencia nucleotídica completa del gen mitocondrial *ND2* (1,047 pb) fue amplificada con los oligonucleótidos ND2F: 5'-AAC CCA TRC YCA AGA GAT CA-3' y ND2R: 5'-ACT TCT RCT TAR AGC TTT GAA GG-3' diseñados a partir de otras secuencias de ciprínidos disponibles en el GenBank. Las condiciones de amplificación de *Cyt-b* y *ND2* comprendieron una desnaturalización inicial por 5 minutos a 94° C seguida de 35 ciclos de 50 segundos a 94° C, 50 segundos de temperatura de alineamiento a 50° C para *Cyt-b* y 60° C para *ND2*, seguido de 2 minutos a 72° C. La extensión final se llevó a cabo a 72° C por 7 minutos. Una región de 651 pb del gen mitocondrial *COXI* fue amplificada con los oligonucleótidos FishF2_t1: 5'-TCT ACA AAY CAC AAA GAC ATT GGT AC-3' y FishR2_t1: 5'-ACC TCT GGG TGR CCA AAG AAT CAG AA-3' de Ivanova *et al.* (2007). Las condiciones de amplificación para *COXI* comprendieron una desnaturalización inicial por 5 minutos a 94° C seguida de 34 ciclos de 50 segundos a 94° C, 50 segundos a 50° C y 1 minuto a 72° C y una extensión final de 72°

C por 7 minutos. Para determinar si el producto de PCR obtenido era del tamaño esperado para cada gen, se tomó una muestra de 2 μ l, se realizó una electroforesis y se visualizó mediante geles de agarosa (Sigma-Aldrich) preparados al 1% con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen) para comparar con el peso molecular de la banda obtenida. Las imágenes de los geles expuestos a luz UV fueron capturadas con la ayuda de un fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio_Imaging System). Los productos de PCR fueron enviados a la compañía Macrogen en Seoul, Korea para su purificación y secuenciación en ambos sentidos de la cadena.

IV.4. Análisis filogenéticos y estimación del tiempo de divergencia para el linaje de *Gila eremica*

Los análisis filogenéticos para el linaje de *G. eremica* incluyeron poblaciones de la cuenca del Río Sonora (subcuencas de los ríos Sonora y San Miguel) y de la cuenca del Río Mátape (subcuenca del Río Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre en los cañones La Balandrona y La Pirinola). Adicionalmente los análisis filogenéticos incluyeron secuencias utilizadas por Schönhuth *et al.* (2014) para la inferencia filogenética del género (Tabla 3, Figura 1). Las secuencias obtenidas en nuestro análisis fueron editadas y ensambladas con el software Chromas Pro v1.6. La identidad de cada gen fue determinada en BLAST (Altschul *et al.*, 1990) con otros genes del GenBank. Las relaciones filogenéticas de *Gila cf. eremica* de los cañones La Balandrona y La Pirinola fueron primeramente evaluadas mediante el gen *Cyt-b* contra nuestras secuencias y las secuencias de *Gila* spp. utilizadas por Schönhuth *et al.* (2014). Las relaciones evolutivas de las dos poblaciones de *G. cf. eremica* fueron corroboradas con el concatenado de las secuencias de los genes mitocondriales obtenidas en este estudio y otros congéneres disponibles en el GenBank.

Tabla 3. Taxa, marcadores moleculares, números de acceso, números de catálogo y referencias de las fuentes de los ejemplares utilizados en los análisis de inferencia filogenética. Los detalles de las localidades de recolecta se muestran en la Tabla 1.

Taxón	Localidad	Gen	No. de acceso	Número de catálogo	Referencia
<i>G. eremica</i>	1	<i>Cyt-b</i>	KF514191	MNCN-279687	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
			KF514192	MNCN-279687	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
			KX855966	USON-1301-1	Este estudio
			KX855967	USON-1301-3	Este estudio
			KX855968	USON-1301-15	Este estudio
			KX855969	USON-1301-17	Este estudio
			KX855970	USON-1301-25	Este estudio
		<i>ND2</i>	KX858655	USON-1301-1	Este estudio
			KX858656	USON-1301-15	Este estudio
			<i>COXI</i>	KX858664	USON-1301-1
<i>G. eremica</i>	5	<i>Cyt-b</i>	KF514189	MNCN-279686	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
<i>G. eremica</i>	8	<i>Cyt-b</i>	JX443052	UAIC-15297	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
			KX855971	USON-1304-1	Este estudio
			KX855972	USON-1304-6	Este estudio
		<i>ND2</i>	KX858657	USON-1304-6	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858665	USON-1304-6	Este estudio
<i>G. eremica</i>	10	<i>Cyt-b</i>	KX855973	USON-1376-4	Este estudio
			KX855974	USON-1376-9	Este estudio
			KX855975	USON-1376-25	Este estudio
		<i>ND2</i>	KX858658	USON-1376-4	Este estudio
			KX858659	USON-1376-9	Este estudio
			KX858660	USON-1376-25	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858666	USON-1376-9	Este estudio
<i>G. eremica</i>	11	<i>Cyt-b</i>	KF514193	UAIC-15296	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
<i>G. cf. eremica</i>	12	<i>Cyt-b</i>	KX855976	USON-1300-17	Este estudio
			KX855977	USON-1300-18	Este estudio
			KX855978	USON-1300-29	Este estudio
		<i>ND2</i>	KX858649	USON-1300-17	Este estudio
			KX858650	USON-1300-18	Este estudio
			KX858651	USON-1300-29	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858667	USON-1300-17	Este estudio
<i>G. cf. eremica</i>	13	<i>Cyt-b</i>	KX855981	USON-1302-7	Este estudio
			KX855979	USON-1302-12	Este estudio
			KX855980	USON-1302-13	Este estudio
		<i>ND2</i>	KX858654	USON-1302-7	Este estudio
			KX858652	USON-1302-12	Este estudio
			KX858653	USON-1302-13	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858668	USON-1302-7	Este estudio

<i>G. purpurea</i>	14	<i>Cyt-b</i>	JX443020	BYU-14072	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
		<i>ND2</i>	KX858661	USON-1378-1	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858669	USON-1378-1	Este estudio
<i>G. minacae</i>	18	<i>Cyt-b</i>	KF514195	UAIC-14983	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
		<i>ND2</i>	KX858663	USON-1224-1	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858671	USON-1224-1	Este estudio
<i>G. ditaenia</i>	16	<i>Cyt-b</i>	JX443022	UAIC-15299	Schönhuth <i>et al.</i> (2014)
		<i>ND2</i>	KX858662	USON-1377-1	Este estudio
		<i>COXI</i>	KX858670	USON-1377-1	Este estudio

Las hipótesis filogenéticas mediante *Cyt-b* y la secuencia de los genes concatenados fueron resueltas con los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Previo al análisis de máxima verosimilitud se determinó que el modelo más óptimo de sustitución de nucleótidos para el análisis de ML fue el GTR + G + I obtenido mediante las pruebas de tasa jerárquica de verosimilitud (hLRTs por sus siglas en inglés) y el criterio de información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés) (Posada y Buckley, 2004) obtenidos en ModelTest 3.2 (Posada y Crandall, 1998). Este modelo se utilizó para calcular los valores y la topología del árbol a partir de una búsqueda de ML utilizando el intercambio de ramas (branch-swapping search) para un árbol de alta verosimilitud con los parámetros recuperados en el programa PAUP* (Swofford, 2002). El árbol fue utilizado como el árbol de inicio para un análisis de bootstrap no paramétrico de 1,000 pseudo réplicas para estimar el soporte de nodos en el análisis de ML. Los árboles fueron editados utilizando el programa FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014).

El análisis de Inferencia Bayesiana se realizó mediante una búsqueda de cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) de 1.0×10^8 generaciones en BEAST (Drummond *et al.*, 2012), con un registro de árboles y parámetros cada 10,000 generaciones. Se aplicó un proceso de especiación de Yule prior y un modelo de reloj relajado con tasas de ramificación extraídas de una distribución lognormal no correlacionada (Media = 0, Desviación estándar = 1). Se utilizó Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) para evaluar la normalidad y verificar que los valores de tamaño de muestra efectivo (ESS) estuvieran por encima de 200. El árbol del clado de máxima credibilidad (MCC) fue seleccionado (posterior a un Burning-in de 50%) mediante

el programa Tree Annotator v1.8.2 (Rambaut y Drummond, 2015). Los Árboles finales de ML e IB fueron visualizados y editados en FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014).

Los tiempos de divergencia y los intervalos de credibilidad (HPD, por sus siglas en inglés) del linaje de *G. eremica* se estimaron con el gen mitocondrial *Cyt-b* en BEAST v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Debido a que BEAST estima tanto la topología como el tiempo de divergencia del árbol, el análisis no requiere un grupo externo, sin embargo se incluyó a *Gila purpurea* como el pariente más cercano del linaje de *G. eremica*. La topología de árbol resultante se utilizó para inferir los tiempos de divergencia. El análisis se realizó mediante el modelo de evolución GTR + I + G con un árbol de especiación Yule y un modelo de reloj relajado con tasas de ramificación extraídas de una distribución lognormal no correlacionada (Drummond *et al.*, 2006). El punto de calibración que representa el ancestro común más reciente (MRCA, por sus siglas en inglés) se derivó de *Gila turneri* (Eastman, 1917), el fósil más antiguo reportado para el género *Gila*, que data del Mioceno medio, ~ 12 millones de años (Ma) en la Formación Esmeralda, Nevada, EUA (Uyeno y Miller, 1963, Smith *et al.*, 2000, Dowling *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002). El nodo que representa al MRCA fue dado en una distribución lognormal con un desplazamiento de 12 Ma, una media de 1.5 y una desviación estándar de 0.55, lo que produce una edad mediana de 16.48 Ma y un intervalo del 95%, extendiéndose hasta el comienzo del Mioceno (23.07 Ma). El análisis fue corrido por 1.0×10^8 generaciones de cadena de Markov, iniciado con árboles de partida aleatoria. Los parámetros fueron muestreados con TreeAnnotator (Rambaut y Drummond, 2015) cada 1,000 generaciones con un posterior Burning-in de 10% de los árboles. El software Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) fue utilizado para evaluar la normalidad y verificar que los valores de ESS estaban por encima de 200 para todos los parámetros. El árbol fue visualizado y editado en FigTree. 1.4.2 (Rambaut, 2014).

IV.5. Análisis del código de barras del ADN basado en caracteres

El análisis del código de barras del ADN se realizó para individuos de todo el linaje de *G. eremica* junto con *G. purpurea* y se incluyó a *G. ditaenia* como grupo externo (Tabla 4, Figura

1). Primeramente se llevó a cabo un análisis tradicional de distancias genéticas bajo el criterio de Kimura 2 parámetros (K2P) en el software MEGA v5 (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2011) y se construyó un árbol de Vecino más Cercano (NJ, por sus siglas en inglés) con 1,000,000 de réplicas de bootstrap en PAUP* (Swofford, 2002). Se realizó un análisis para determinar el perfil de red haplotípica de las muestras analizadas con el software Network v5.0.0.0 (Fluxus-engineering.com). El árbol obtenido en PAUP* fue incorporado al archivo NEXUS de la matriz de datos de los *Gila* analizados mediante el software Mesquite v3.10 (Maddison y Maddison, 2016). El archivo NEXUS/TREE obtenido fue editado según las especificaciones de Jörger and Schrödl (2014) y fue corrido en el software CAOS (Sarkar *et al.*, 2008) para obtener el código de barras basado en caracteres de los especímenes analizados.

IV.6. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de *Gila eremica*

Los análisis de variabilidad genética para el linaje de *Gila eremica* se realizaron a partir de siete poblaciones conformadas por especímenes de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre. Las poblaciones de la cuenca del Río Sonora incluyeron las localidades 1 (n = 30), 2 (n = 25), 3 (n = 30) y 8 (n = 35) de las subcuencas de los ríos Bacanuchi, Bacoachi y San Miguel. La población de la cuenca del Río Mátape incluyó muestras de la subcuenca del Río Mátape en la localidad 10 (n = 32) y la subcuenca del Arroyo El Tigre incluyó muestras de *Gila* cf. *eremica* de los cañones La Balandrona (Localidad 12, n = 32) y La Pirinola (Localidad 13, n = 32) (Tabla 1, Figura 1).

La variabilidad genética para las poblaciones del linaje de *G. eremica* se analizó en el programa Arlequín 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) con las pruebas de diversidad de gene, número de loci analizados, sitios polimórficos (*S*), diversidad de nucleótido, frecuencia haplotípica y se llevó a cabo el análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 2005) a partir de 10,000 permutaciones para corroborar su significancia estadística. El criterio para datos mitocondriales fue implementado en el AMOVA mediante un modelo de matriz de distancias con diferencias pareadas (Excoffier *et al.*, 1992). La variabilidad genética se analizó primeramente para las siete poblaciones del linaje de *G. eremica* y posteriormente se realizó

un análisis jerárquico de varianza molecular para determinar la variabilidad genética entre las poblaciones de las tres regiones analizadas (cuena del Río Sonora, sub-cuenca del Río Mátape y sub-cuenca del Arroyo El Tigre). El valor obtenido del índice de diferenciación genética (F_{st}) en el análisis de AMOVA se probó mediante la hipótesis $F_{st} = 0$ con la fórmula $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$, con g.l. = $(k-1)(s-1)$, en donde k es el número de alelos diferentes, N el número de organismos y s el número de muestras (Workman y Niswander, 1970). Se estimó el número de migrantes por generación de acuerdo a $Nem = (F_{st}^{-1}-1)/2$ (Hartl, 1981). Se utilizó el software Network v5.0.0.0 (Fluxus-engineering.com) para obtener el perfil de red haplotípica y determinar el haplotipo basal para las poblaciones de *G. cf. eremica* en los cañones La Balandrona y La Pirinola.

Tabla 4. Especies, localidades, números de catálogo y números de acceso al GenBank de las secuencias del gen *COXI* obtenidos en este estudio para el análisis del código de barras del ADN. Los detalles de las localidades (Loc) de recolecta se muestran en la Tabla 1.

Especie	Loc	No. de catálogo	No. de Acceso	No. de catálogo	No. de Acceso
<i>G. eremica</i>	1	USON-1301-1	KX858664	USON-1301-9	Pendiente
	n = 11	USON-1301-2	Pendiente	USON-1301-10	Pendiente
		USON-1301-3	Pendiente	USON-1301-11	Pendiente
		USON-1301-4	Pendiente	USON-1301-12	Pendiente
		USON-1301-5	Pendiente	USON-1301-13	Pendiente
		USON-1301-6	Pendiente		
	8	USON-1304-1	Pendiente	USON-1304-8	Pendiente
	n = 12	USON-1304-2	Pendiente	USON-1304-11	Pendiente
		USON-1304-4	Pendiente	USON-1304-13	Pendiente
		USON-1304-5	Pendiente	USON-1304-14	Pendiente
		USON-1304-6	KX858665	USON-1304-15	Pendiente
		USON-1304-7	Pendiente	USON-1304-16	Pendiente
	10	USON-1376-1	Pendiente	USON-1376-11	Pendiente
	n= 11	USON-1376-2	Pendiente	USON-1376-12	Pendiente
		USON-1376-3	Pendiente	USON-1376-13	Pendiente
		USON-1376-5	Pendiente	USON-1376-14	Pendiente
		USON-1376-6	Pendiente	USON-1376-15	Pendiente
		USON-1376-9	KX858666		
	<i>G. cf. eremica</i>	12	USON-1300-17	KX858667	USON-1300-25
n = 15		USON-1300-18	Pendiente	USON-1300-26	Pendiente
		USON-1300-19	Pendiente	USON-1300-27	Pendiente
		USON-1300-20	Pendiente	USON-1300-28	Pendiente

		USON-1300-21	Pendiente	USON-1300-29	Pendiente
		USON-1300-22	Pendiente	USON-1300-30	Pendiente
		USON-1300-23	Pendiente	USON-1300-31	Pendiente
		USON-1300-24	Pendiente		
	13	USON-1302-2	Pendiente	USON-1302-9	Pendiente
	n = 14	USON-1302-3	Pendiente	USON-1302-10	Pendiente
		USON-1302-4	Pendiente	USON-1302-11	Pendiente
		USON-1302-5	Pendiente	USON-1302-13	Pendiente
		USON-1302-6	Pendiente	USON-1302-14	Pendiente
		USON-1302-7	KX858668	USON-1302-15	Pendiente
		USON-1302-8	Pendiente	USON-1302-16	Pendiente
<i>G. purpurea</i>	14	USON-1378-1	KX858669	USON-1378-5	Pendiente
	n = 8	USON-1378-2	Pendiente	USON-1378-6	Pendiente
		USON-1378-3	Pendiente	USON-1378-7	Pendiente
		USON-1378-4	Pendiente	USON-1378-8	Pendiente
<i>G. ditaenia</i>	16	USON-1377-1	KX858670	USON-1377-6	Pendiente
	n = 10	USON-1377-2	Pendiente	USON-1377-7	Pendiente
		USON-1377-3	Pendiente	USON-1377-8	Pendiente
		USON-1377-4	Pendiente	USON-1377-9	Pendiente
		USON-1377-5	Pendiente	USON-1377-10	Pendiente

V. RESULTADOS

V.1. Caracterización morfométrica del linaje de *Gila eremica*

El análisis de función discriminante (AFD) para los 219 ejemplares de *Gila* en nueve subcuencas de Sonora seleccionó 36 de 39 caracteres morfológicos analizados (Tabla 5). El valor global de la lambda de Wilks (λ) fue 0.00001 ($p < 0.0000$) lo que indica un alto grado de discriminación entre los grupos analizados. El AFD mostró 16 variables significativas ($p < 0.001$) obtenidas en el análisis y fueron, el diámetro del ojo ($\lambda = 0.000007$), profundidad del pedúnculo caudal ($\lambda = 0.000007$), longitud de la cabeza ($\lambda = 0.000007$), ancho interorbital carnososo ($\lambda = 0.000007$), longitud postorbital ($\lambda = 0.000007$), longitud de la mandíbula superior ($\lambda = 0.000007$), origen de la aleta dorsal al origen de la aleta anal ($\lambda = 0.000007$), número de branquiespinas ($\lambda = 0.000007$), longitud de la aleta dorsal ($\lambda = 0.000007$), longitud de la aleta pectoral ($\lambda = 0.000007$) longitud de la aleta pélvica ($\lambda = 0.000007$), radios de la aleta dorsal ($\lambda = 0.000007$), radios de la aleta pélvica izquierda ($\lambda = 0.000008$), ancho del cuerpo ($\lambda = 0.000009$), escamas en la línea lateral ($\lambda = 0.000011$), radios de la aleta pectoral ($\lambda = 0.000013$) (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de significancia de lambda de Wilks (p) y tolerancia para 36 variables morfométricas y merísticas seleccionadas por el AFD para los *Gila* analizados.

Wilks y a posteriori, Lambda: 0.00001 approx. F (396,1847) = 10.085 $p < 0.0000$					
	Wilks	Parcial	F-remove	Nivel- p	Tolerancia
Escamas en la línea lateral	0.000011	0.488753	16.35601	0.000000	0.689506
Radio de la aleta pectoral	0.000013	0.423103	21.32006	0.000000	0.812193
Ancho del cuerpo	0.000009	0.620300	9.57140	0.000000	0.393929
Radio de la aleta pélvica izquierda	0.000008	0.695419	6.84843	0.000000	0.750890
Diámetro del ojo	0.000007	0.740949	5.46679	0.000000	0.731614
Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta anal	0.000007	0.766875	4.75335	0.000002	0.376914
Número de branquias	0.000007	0.742800	5.41419	0.000000	0.798986
Longitud de la mandíbula superior	0.000007	0.767180	4.74526	0.000002	0.590169
Largo de la cabeza	0.000007	0.808984	3.69202	0.000099	0.267669
Ancho interorbital carnoso	0.000007	0.788881	4.18459	0.000017	0.499793
Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta pélvica	0.000006	0.838593	3.00959	0.001080	0.229160
Profundidad del pedúnculo caudal	0.000007	0.774429	4.55446	0.000005	0.405759
Origen de la aleta anal a la placa hipural	0.000006	0.859766	2.55040	0.005179	0.522077
Longitud de la aleta dorsal	0.000007	0.755945	5.04815	0.000001	0.625851
Radio de la aleta dorsal	0.000007	0.739079	5.52018	0.000000	0.775450
Longitud de la barbilla al istmo	0.000006	0.847017	2.82415	0.002046	0.379835
Longitud postorbital	0.000007	0.780665	4.39317	0.000008	0.487151
Ancho de la boca	0.000006	0.863213	2.47778	0.006602	0.602724
Origen de la aleta dorsal a la base del último radio en la aleta anal	0.000006	0.876050	2.21234	0.015789	0.451316
Longitud media dorsal de la cabeza	0.000006	0.878945	2.15356	0.019076	0.460327
Profundidad de la cabeza	0.000006	0.851767	2.72119	0.002908	0.351721
Longitud de la aleta pectoral	0.000007	0.722332	6.01070	0.000000	0.397810
Longitud de la aleta pélvica	0.000007	0.795990	4.00757	0.000032	0.386918
Ancho de la cabeza	0.000006	0.839579	2.98770	0.001165	0.372947
Longitud predorsal	0.000006	0.920384	1.35259	0.199661	0.553359
Longitud del hocico	0.000006	0.841030	2.95556	0.001302	0.563181
Longitud del pedúnculo caudal	0.000006	0.863928	2.46278	0.006940	0.330058
Origen de la aleta pectoral al origen de la aleta pélvica	0.000006	0.866767	2.40351	0.008449	0.452833
Origen de la aleta pectoral al margen posterior de la órbita	0.000006	0.906828	1.60657	0.100529	0.526182
Profundidad del cuerpo	0.000006	0.893565	1.86248	0.047374	0.250209
Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta pectoral	0.000006	0.905253	1.63657	0.092301	0.465614
Origen de la aleta dorsal a la placa hipural	0.000006	0.914284	1.46594	0.148281	0.473273
Longitud de la aleta caudal	0.000006	0.910403	1.53884	0.121524	0.749141
Origen de la aleta pélvica al origen de la aleta anal	0.000006	0.918271	1.39168	0.180502	0.665490
Longitud del hocico al istmo	0.000006	0.925189	1.26437	0.248887	0.376851
Radio de la aleta anal	0.000006	0.926458	1.24121	0.263238	0.773844

Los coeficiente estandarizados de las variables canónicas (raíces) uno y dos obtenidos por el AFD explicaron el 51.67% y 72.36% de la variación entre las poblaciones analizadas, con nueve principales variables para discriminar a los grupos (Tabla 6). Para la raíz canónica uno, las variables con mayores efectos fueron, las escamas en la línea lateral ($Y = 0.76974$), diámetro del ojo ($Y = 0.47073$), radios de la aleta pélvica izquierda ($Y = 0.44503$) y ancho interorbital carnososo ($Y = -0.30356$). Para la raíz dos, las variables con mayor efecto fueron, radios de la aleta pectoral ($Y = 0.769969$), longitud del pedúnculo caudal ($Y = 0.404508$), longitud de la aleta dorsal ($Y = -0.355048$), longitud de la barbilla al istmo ($Y = -0.325370$) y longitud de la aleta pélvica ($Y = 0.309796$). El análisis de clasificación predictiva de los individuos para todos los grupos mostró un valor global del 97.7%. Los especímenes de la población de *G. eremica* de la subcuenca del Río Sonora (90%) compartieron dos individuos con la población de la subcuenca del Río San Miguel (100%) y las poblaciones de *G. cf. eremica* del cañón La Pirinola (96.6%) compartió un individuo con el cañón La Balandrona (100%).

Tabla 6. Coeficientes estandarizados de variables canónicas uno y dos resultantes del AFD para los datos morfométricos para poblaciones de *Gila* analizadas.

Variable	Raíz 1	Raíz 2
Escamas en la línea lateral	0.76974	0.223118
Radios de la aleta pectoral	-0.11876	0.769969
Ancho del cuerpo	0.21254	-0.081903
Radios de la aleta pélvica izquierda	0.44503	0.251517
Diámetro del ojo	0.47073	-0.093308
Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta anal	-0.16995	0.292728
Numero de branquiespinas	0.26933	-0.095938
Longitud de la mandíbula superior	0.08110	-0.112509
Longitud de la cabeza	-0.10649	-0.137349
Ancho interorbital carnososo	-0.30356	0.225682
Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta pélvica	-0.06771	-0.043964
Longitud del pedúnculo caudal	-0.09354	0.118636
Origen de la aleta anal a la placa hipural	0.09056	-0.226180
Longitud de la aleta dorsal	0.33916	-0.355048
Radios de la aleta dorsal	0.09270	0.238970
Longitud de la barbilla al istmo	0.19597	-0.325370
Longitud postorbital	-0.08409	0.172674
Ancho de la boca	-0.05710	0.059838
Origen de la aleta dorsal a la base del último radio en la aleta anal	-0.09337	-0.227314
Longitud media dorsal de la cabeza	0.29850	-0.279097

Profundidad de la cabeza	-0.18544	-0.105579
Longitud de la aleta pectoral	-0.04293	-0.057245
Longitud de la aleta pélvica	0.00245	0.309796
Ancho de la cabeza	-0.05100	0.023703
Longitud predorsal	0.15031	0.025810
Longitud del hocico	0.16754	0.095840
Longitud del pedúnculo caudal	0.04583	0.404508
Origen de la aleta pectoral al origen de la aleta pélvica	0.04220	-0.070744
Origen de la aleta pectoral al margen posterior de la órbita	-0.12483	0.063458
Profundidad del cuerpo	-0.22292	-0.112075
Origen de la aleta dorsal al origen de la aleta pectoral	-0.17920	-0.196471
Origen de la aleta dorsal a la placa hipural	0.15664	-0.088975
Longitud de la aleta caudal	0.21167	-0.008323
Origen de la aleta pélvica al origen de la aleta anal	0.06608	0.000897
Longitud de la barbilla al istmo	0.08791	-0.169208
Radios de la aleta anal	-0.23251	-0.008403
Eigenvalor	22.21117	8.891306
Cum.Prop	0.51675	0.723607

El diagrama de árbol de las distancias cuadráticas de Mahalanobis (D^2) (Figura 3) clasificó cinco grupos a un nivel de corte del 60%: (1) Todas las poblaciones de *G. eremica* de las subcuencas de los ríos Sonora, San Miguel y Mátape, incluyendo a los paratipos examinados, (2) los individuos de *G. purpurea* del Arroyo San Bernardino, (3) las poblaciones de *G. cf. eremica* de los cañones La Balandrona y La Pirinola, (4) las poblaciones de *G. ditaenia* de las subcuencas de los ríos Atar y Magdalena y (5) *G. minacae* de la subcuenca del Río Bavispe. Ambas poblaciones de *G. cf. eremica* fueron notablemente discriminadas de la *G. eremica* nominal y *G. purpurea*. De igual manera *G. cf. eremica* de ambas poblaciones fue discriminada de *G. ditaenia* y de *G. minacae*, esta última la población de *Gila* morfológicamente más distante del complejo analizado (Figura 3).

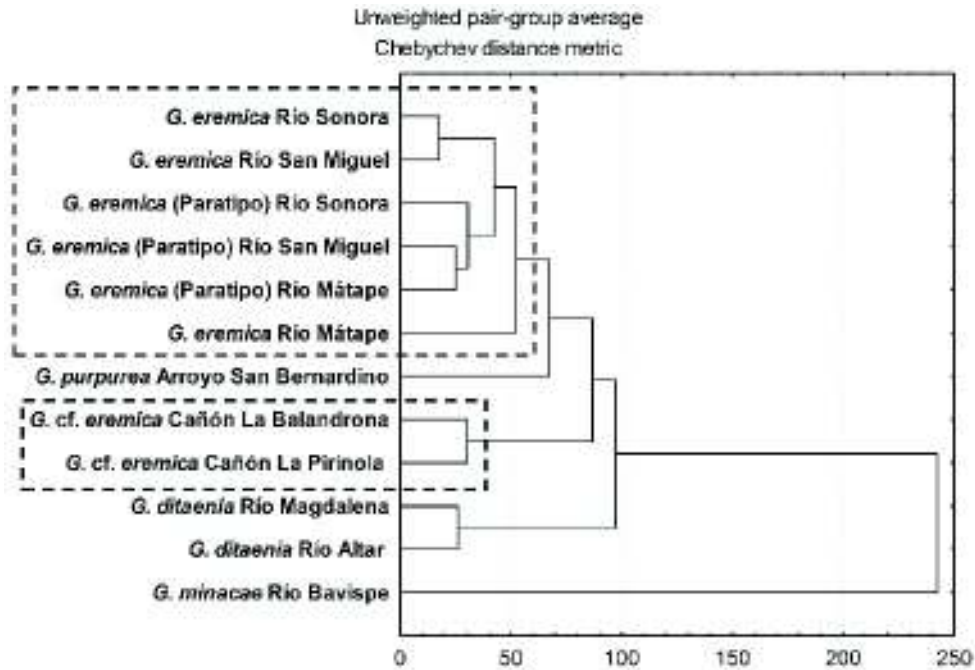


Figura 3. Diagrama de árbol resultante de las distancias cuadráticas de Mahalanobis para las poblaciones de *Gila* analizadas.

El diagrama de dispersión resultante de la categorización sobre la base de las raíces canónicas uno y dos para las 12 poblaciones de *Gila* examinadas coloraron a los individuos en su respectivo grupo (Figura 4). Los especímenes de *G. eremica* de las subcuencas de los ríos Sonora, San Miguel, Mátape y los paratipos analizados fueron colocados como un solo grupo en el diagrama. Por otra parte el grupo de *G. eremica* fue colocado en yuxtaposición con *G. purpurea*, lo que sugiere una cercana relación morfológica entre las especies. Ambas poblaciones de *G. ditaenia* de las subcuencas de los ríos Altar y Magdalena fueron colocadas en un solo grupo aislado del resto de los grupos analizados. *G. minacae* resultó ser el grupo morfológicamente más aislado. Las poblaciones de *G. cf. eremica* de los cañones La Balandrona y La Pirinola fueron colocadas en un solo grupo y resultaron morfológicamente aisladas de todas las especies de *Gila* incluidas en el análisis.

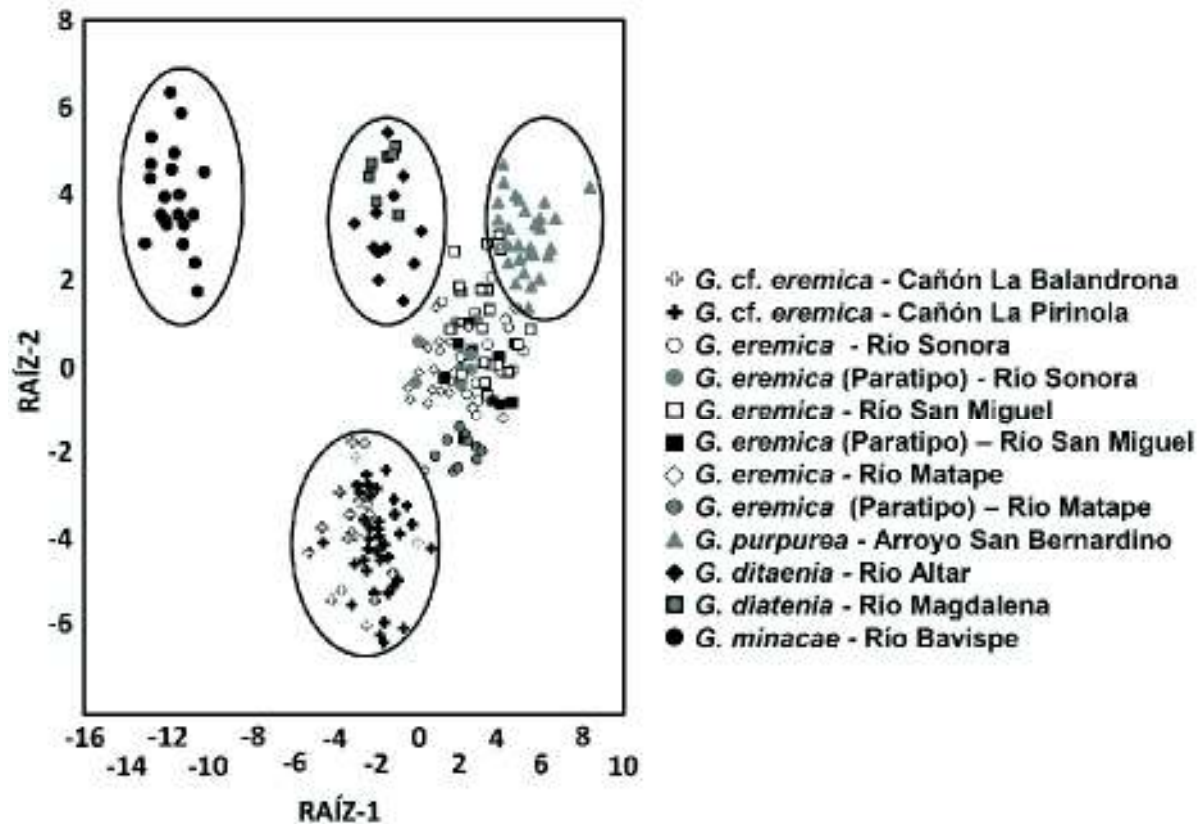


Figura 4. Gráfico de dispersión de las poblaciones de *Gila* analizadas (ver Tabla 6 para los coeficientes estandarizados de las variables canónicas).

Los diagramas de cajas mostraron 16 caracteres lineales y merísticos como los más útiles para distinguir a *G. cf. eremica* de las poblaciones de *G. eremica* nominal de las subcuencas de los ríos Sonora, San Miguel y Mátape. Los caracteres lineales de longitud media dorsal de la cabeza, aleta caudal, barbilla al istmo, hocico al istmo, aleta dorsal y diámetro del ojo ilustrados en los diagramas de cajas mostraron ser más largos en *G. cf. eremica* contra *G. eremica* nominal (Figura 5 A-F). Por otra parte, los gráficos de cajas mostraron que *G. cf. eremica* posee un menor tamaño para el ancho de la cabeza, la longitud y profundidad del pedúnculo caudal (Figura 5 G-I), el origen de la aleta dorsal al origen de las aletas pectoral, pélvica y anal, el origen de la aleta pectoral a la órbita del ojo, la profundidad del cuerpo, el ancho interorbital carnoso y el ancho de la boca comparada con *G. eremica* (Figuras 5 y 6 G -P). Los caracteres merísticos en los gráficos de cajas detectaron un menor

número de radios en la aleta pectoral y un mayor número de escamas en la línea lateral en *G. cf. eremica* en comparación con *G. eremica* nominal (Figura 6 Q-R).

V.2. Variación en las secuencias del gen mitocondrial *Cyt-b* para las poblaciones del linaje de *Gila eremica*

Las secuencias amplificadas del gen *Cyt-b* para todos los especímenes del linaje de *Gila eremica* analizadas tuvieron una longitud de 1,140 pb sin inserciones ni deleciones. Treinta y cuatro posiciones fueron variables y 15 de ellas fueron parsimoniosamente informativas. Los individuos del linaje de *G. eremica* fueron clasificados en 19 haplotipos. Los haplotipos 8 y 10 estuvieron compartidos entre individuos de las subcuencas de los ríos Sonora y San Miguel de la cuenca del Río Sonora. Ninguno de los haplotipos restantes fue compartido entre miembros de las distintas poblaciones del linaje de *G. eremica*. La distancia no corregida de *p* para la divergencia de las secuencias al interior del linaje de *G. eremica* tuvo un rango entre 0.26% y 1.11% con un promedio de 0.70%. Las secuencias de los individuos de *G. eremica* de las subcuencas de los ríos Sonora, San Miguel y Mátape tuvieron una distancia genética de 0.44 a 1.14% contra las poblaciones de *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre. La distancia promedio entre las poblaciones de *G. eremica* nominal y *G. cf. eremica* fue de 0.83%. La distancias de los individuos de *G. eremica* nominal contra *G. purpurea* fue de 1.93 a 2.72%. Para las poblaciones *G. cf. eremica* y *G. purpurea* la distancia tuvo un rango de 2.11 a 2.46%.

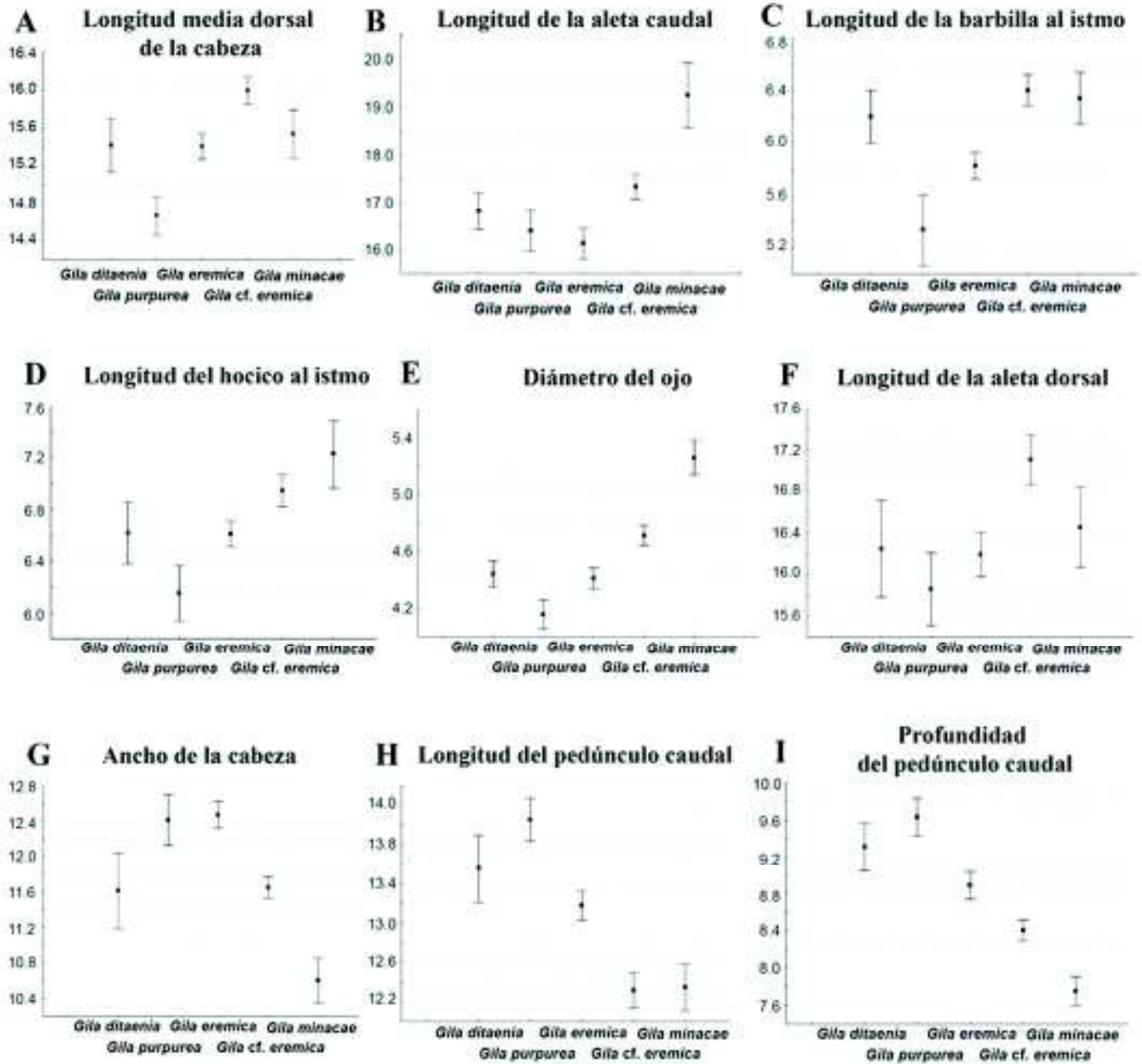


Figura 5. Gráficos de cajas (medias e intervalos de confianza de 0.95) de las variables morfométricas y merísticas más distinguibles para discriminar a *Gila cf. eremica*.

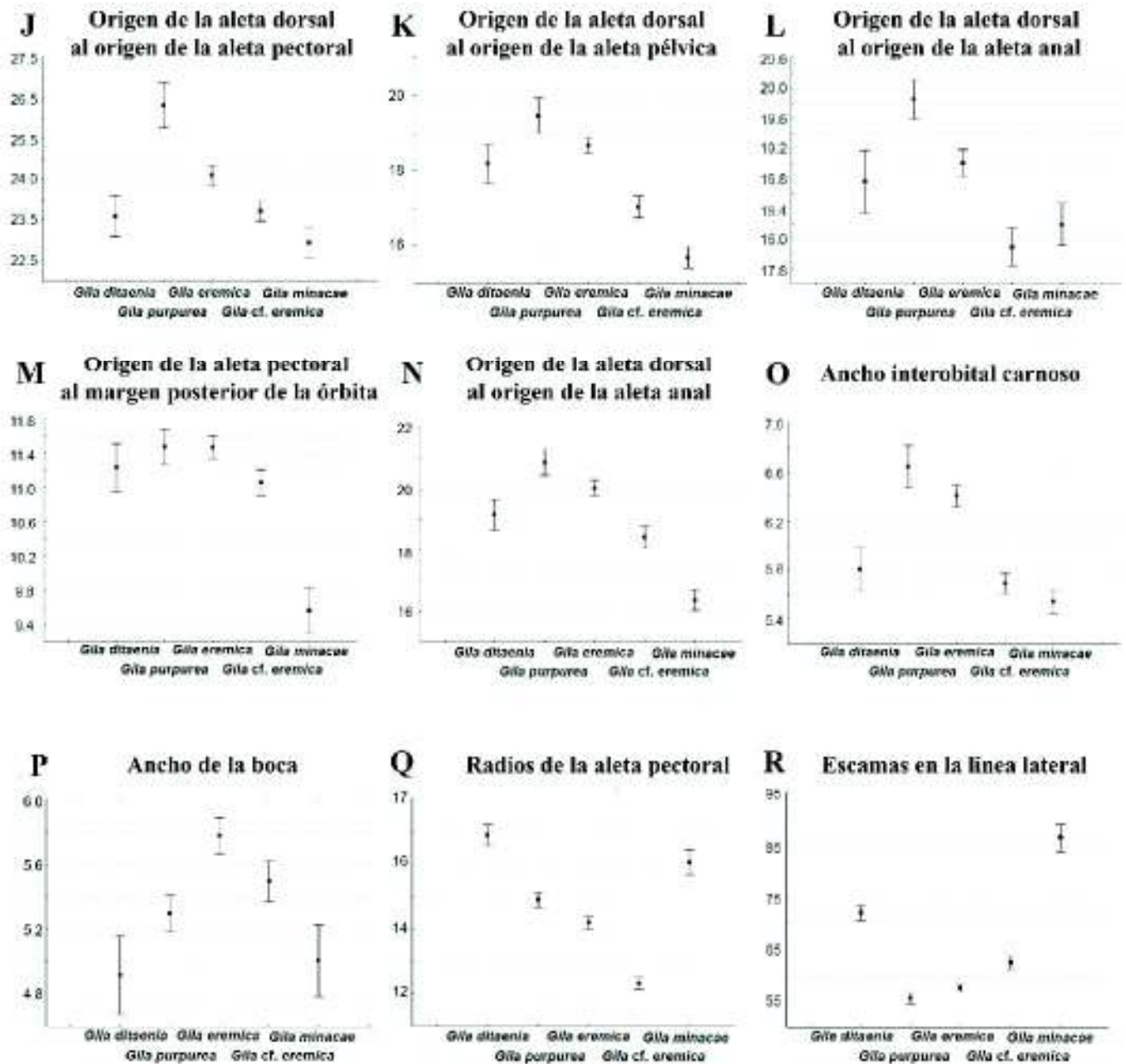


Figura 6. Gráficos de cajas (medias e intervalos de confianza de 0.95) de las variables morfométricas y merísticas más distinguibles para discriminar a *Gila cf. eremica*.

V.3. Relaciones filogenéticas y tiempo de divergencia de las poblaciones del linaje de *G. eremica*

Las inferencias filogenéticas de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) con el gen *Cyt-b* para el linaje de *G. eremica* mostraron la misma topología para ambos criterios con variaciones en los valores de bootstrap (BP) y probabilidades posteriores (PP) (Figura 7). Los miembros del linaje de *G. eremica* siempre fueron resueltos como un grupo monofilético soportado por altos valores de BP (99%) y PP (100%), con *G. purpurea* como su clado hermano (BP = 98%, PP = 100%) (Figura 7). El análisis filogenético resolvió clados geográficos al interior del linaje de *G. eremica* con un clado para las poblaciones de las subcuencas de los ríos Sonora y San Miguel de la cuenca del Río Sonora y su clado hermano de la cuenca del Río Mátape conformado por las poblaciones de las subcuencas del Río Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre (BP = 68%, PP = 99%). Los análisis adicionalmente resolvieron un ancestro común putativo entre *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre y *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape (Figura 7).

Los análisis filogenéticos de ML e IB con el concatenado de los marcadores mitocondriales *Cyt-b*, *COXI* y *ND2* fueron integrados por *Gila robusta*, *G. ditaenia*, *G. purpurea*, los miembros del linaje de *G. eremica* y se incluyó a *G. minacae* como grupo externo. La topología de los árboles obtenidos fue el mismo para ambos criterios con diferencias en los valores de BP para ML y PP para IB (Figura 8). Los análisis del concatenado mostraron la misma topología que en *Cyt-b*, evidenciando monofilia (BP = 99%, PP = 100%) y clados geográficos al interior del linaje de *G. eremica* con *G. purpurea* como su clado hermano (BP = 100%, PP = 100%) (Figuras 7 y 8). El clado geográfico para la cuenca del Río Mátape que incluye a las poblaciones de *G. cf. eremica* tuvo un mayor soporte de BP (71%) y PP (100%) en los análisis concatenados en comparación del uso individual de *Cyt-b* (Figuras 7 y 8). Las poblaciones de *G. cf. eremica* de ambos cañones fueron soportadas como un grupo monofilético de identidad específica (Figura 8, BP = 80%, PP = 100%) y mostraron una relación muy cercana con *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape como su pariente más cercano (Figura 8), así como fue resuelto con el uso de solo el *Cyt-b*.

Los datos obtenidos por un reloj molecular relajado sugieren que la divergencia para el clado compuesto por el linaje de *G. eremica* y *G. purpurea* ocurrió hace aproximadamente 15.5 Ma (~20.42-12.91 Ma) en el Mioceno medio (Figura 9). Al interior del linaje de *G. eremica* se estimó un tiempo de divergencia de 7.63 Ma (~13.36-3.85 Ma) para las poblaciones de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape en el Mioceno medio/tardío (Figura 9). El análisis del reloj molecular sugiere que las poblaciones de *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre divergieron de la población de *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape hace aproximadamente 5.60 Ma (~11.03-2.37 Ma) en el Mioceno medio/tardío o a inicios del Plioceno (Figura 9).

V.4. Discriminación de *Gila cf. eremica* por medio del código de barras del ADN

El análisis de 74 secuencias del gen *COXI* en especies de *Gila* mostró nueve haplotipos, cinco para *Gila eremica* nominal uno para *G. cf. eremica*, otro para *G. purpurea* y dos para *G. ditaenia*. El linaje de *G. eremica* con *G. cf. eremica* mostró una diversidad haplotípica y de nucleótido de 0.6093 (Desviación estándar = 0.034) y 0.00125 (Desviación estándar = 0.00112) respectivamente. Los individuos de *G. eremica* de las subcuencas de los ríos Sonora, San Miguel y Mátape compartieron al menos un haplotipo entre ellos y adicionalmente mostraron haplotipos únicos para los individuos de las subcuencas de los ríos Sonora y San Miguel. El análisis no mostró haplotipos compartidos entre *G. cf. eremica* y la *G. eremica* nominal.

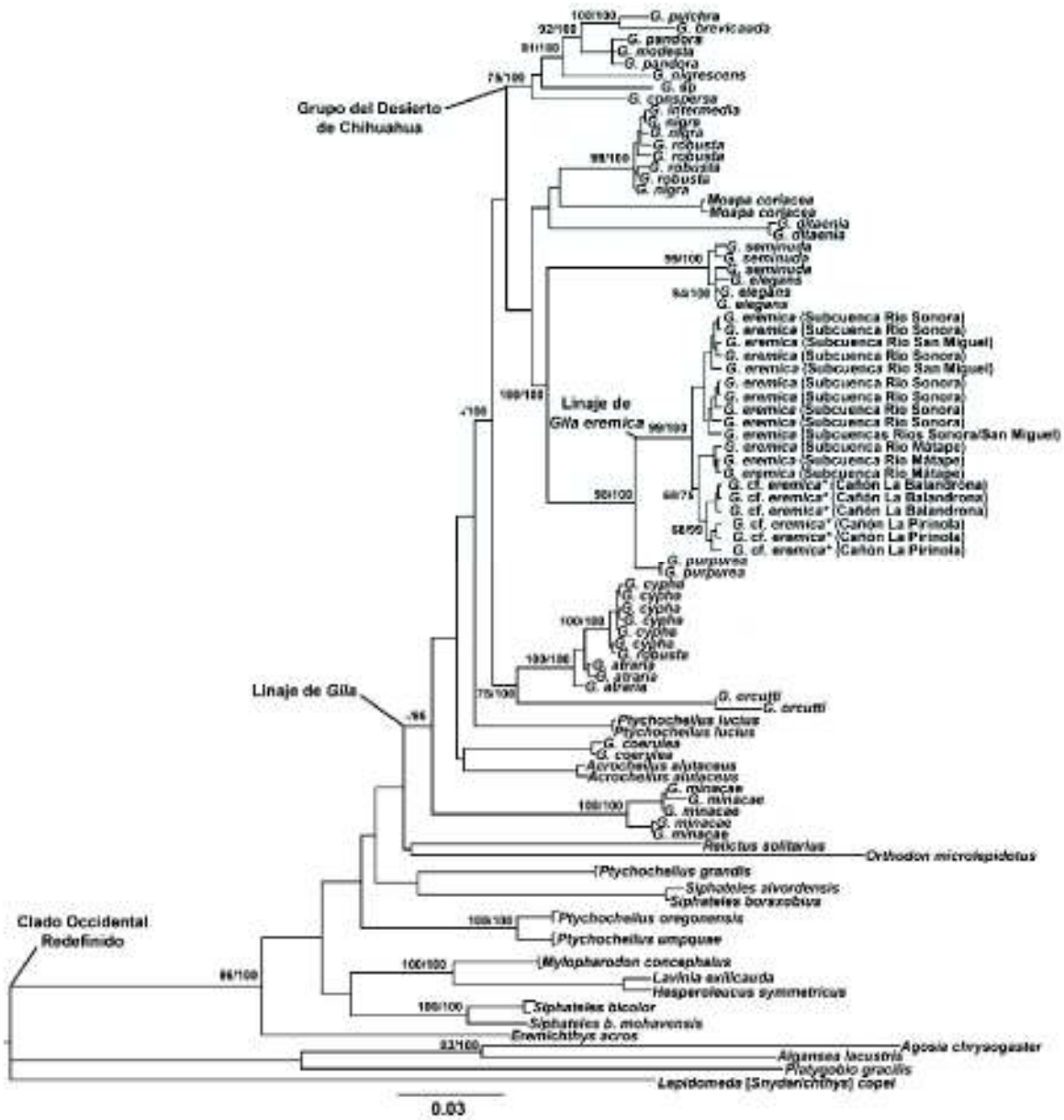


Figura 7. Árbol filogenético resuelto con el gen *Cyt-b* por Máxima verosimilitud (modelo de evolución GTR + G + I) para todos los integrantes del linaje de *Gila* y otros miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012, 2014). Los números en los nodos representan el soporte de bootstrap (BP > 65%)/Inferencia bayesiana (PP > 70%). Los asteriscos (*) representan especímenes de la subcuenca del Arroyo El Tigre.

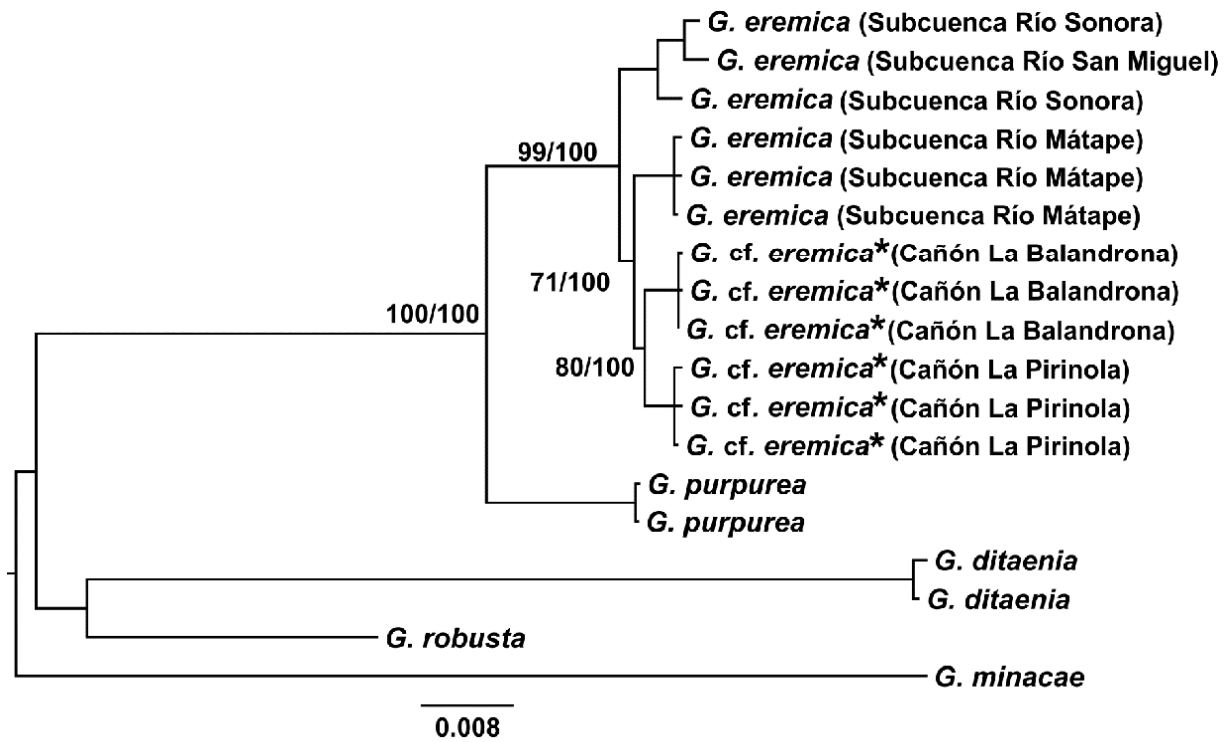


Figura 8. Árbol filogenético resuelto por Máxima verosimilitud con el concatenado de los genes *Cyt-b*, *COXI*, y *ND2* (modelo de evolución GTR + G + I) para las poblaciones del linaje de *Gila eremica*. Los números en los nodos representan el soporte de bootstrap (BP > 65%)/Inferencia bayesiana (PP > 70%). Los asteriscos (*) representan especímenes de la subcuenca del Arroyo El Tigre.

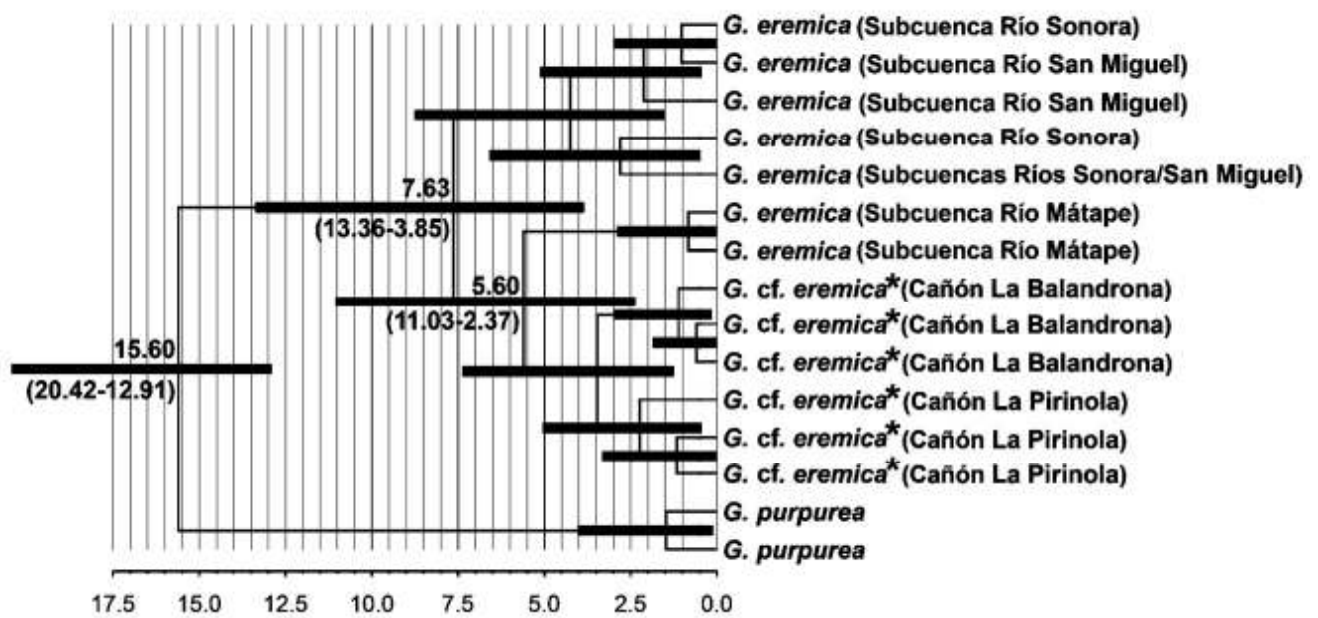


Figura 9. Tiempos estimados en millones de años (Ma) de divergencia entre las poblaciones del linaje de *G. eremica* incluyendo *G. purpurea*. Las barras sobre los nodos representan el tiempo de divergencia de los linajes y los valores en paréntesis bajo los nodos representan el 95% de los intervalos de credibilidad para los tiempos de divergencia. Los asteriscos (*) representan especímenes de la subcuenca del Arroyo El Tigre.

El árbol de distancias genéticas por NJ con K2P resolvió a todos los individuos del linaje de *G. eremica* en un clado monofilético y mostró a la críptica *G. cf. eremica* muy relacionada con los miembros del linaje (Figura 10). El análisis de distancias genéticas por K2P entre grupos mostró un valor de 1.46% entre las poblaciones de *G. eremica* nominal y *G. purpurea*, la distancia entre *G. cf. eremica* y *G. purpurea* fue 1.40% y el valor entre la *G. eremica* nominal y *G. cf. eremica* fue 0.37%.

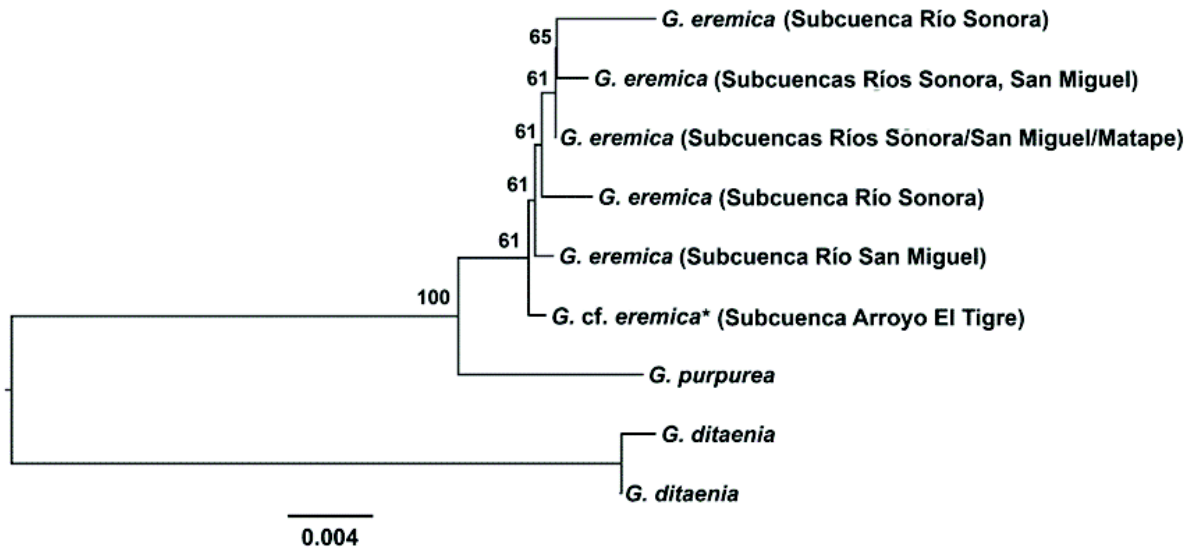


Figura 10. Árbol de distancias genéticas por K2P para el gen *COXI* de los *Gila* analizados. Los valores en los nodos representan el porcentaje de bootstrap.

El potencial haplotipo basal del linaje de *G. eremica* definido por su posición central en la red haplotípica fue detectado para las poblaciones de las subcuencas de los ríos Sonora, San Miguel y Mátape, de donde derivaron el resto de los haplotipos incluyendo el de *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre. El análisis de red haplotípica mostró que los haplotipos al interior de *G. eremica* nominal difirieron entre ellos en no más de tres mutaciones, mientras que el único haplotipo detectado para *G. cf. eremica* difirió de los haplotipos de *G. eremica* nominal de uno a cuatro mutaciones (Figura 11). Los individuos de *G. purpurea* difirieron del linaje de *G. eremica* de ocho a 11 mutaciones.

El análisis del código de barras del ADN basado en caracteres con CAOS mostró siete caracteres puros individuales (sPu) para discriminar a la *G. eremica* nominal de *G.*

purpurea, ocho sPu para discriminar a *G. cf. eremica* de *G. purpurea* y un sPu fijo en la base número 505 de las 29 muestras analizadas de *G. cf. eremica* para discriminarla de la *G. eremica* nominal (Tabla 7).

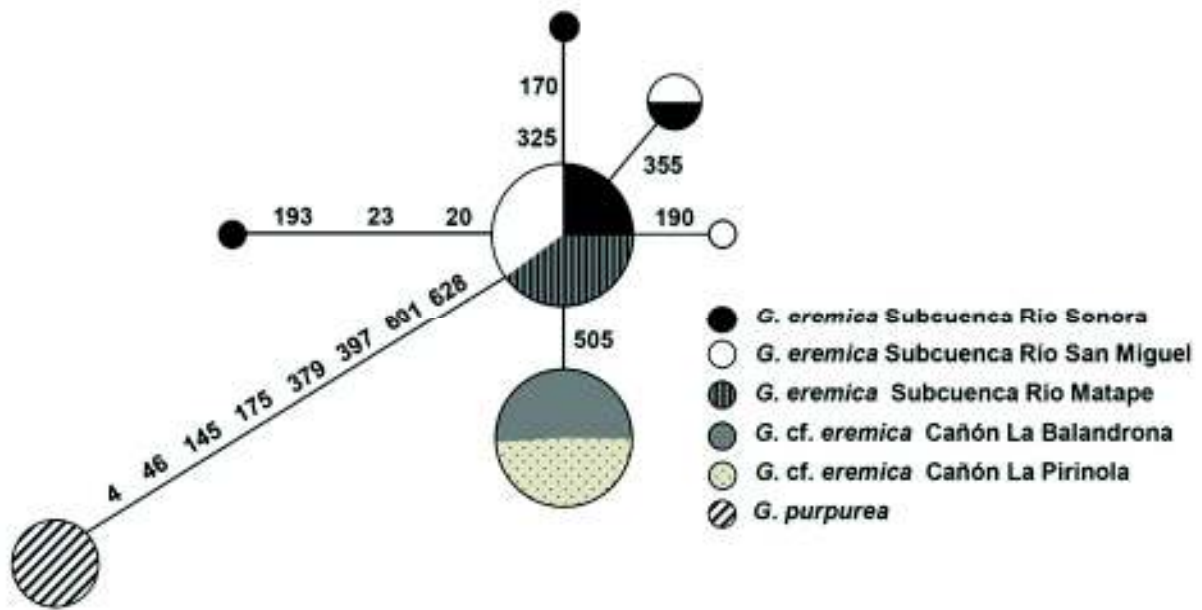


Figura 11. Perfil de red haplotípica para el gen *COXI* de los especímenes de *Gila* analizados. Cada haplotipo es representado por un círculo. El tamaño de los círculos es proporcional a los organismos que presentaron el haplotipo mostrado. Los números en las líneas representan la posición de la mutación del gen.

Tabla 7. Código de barras del ADN para *G. cf. eremica*, *G. eremica* y *G. purpurea* basado en atributos característicos puros (sPu) obtenido por CAOS.

Taxa\Posición	46	145	175	379	397	505	601	628
<i>G. cf. eremica</i>	T	G	T	A	G	G	C	A
<i>G. eremica</i>	T	G	T	A	G	A	C	A
<i>G. purpurea</i>	C	A	C	G	A	A	T	G

V.5. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de *Gila eremica*

Para el análisis de variabilidad genética de las poblaciones del linaje de *Gila eremica* se analizaron 215 secuencias del gen mitocondrial *ND2* todas con una longitud de 1,047 pb sin inserciones ni deleciones. Cincuenta y ocho posiciones fueron variables y 48 fueron parsimoniosamente informativas. El análisis de datos para la distribución de frecuencias haplotípicas mostró un total de 33 haplotipos distribuidos en las poblaciones analizadas. Dieciocho haplotipos fueron únicos y el resto fueron detectados en al menos dos de las poblaciones analizadas. No se detectó ningún haplotipo compartido entre las poblaciones de la cuenca del Río Sonora con las del Río Mátape. Al interior de la cuenca del Río Mátape los cuatro haplotipos de la subcuenca del Río Mátape fueron exclusivos para esa localidad y sólo se detectaron dos haplotipos compartidos entre las poblaciones de *G. cf. eremica* de los cañones La Balandrona y La Pirinola (Tabla 8). El análisis del perfil de red haplotípica para las poblaciones del linaje de *G. eremica* mostró 3 haplogrupos, dos de ellos integrados por individuos de la cuenca del Río Sonora y el otro haplogrupo integrado por las poblaciones de la cuenca del Río Mátape que resultó ser el más distante del haplotipo basal (Figura 12). La posición central en la red del haplotipo 24 integrado por individuos de todas las cuatro poblaciones de la cuenca del Río Sonora lo sugieren como el potencial haplotipo basal del linaje de *G. eremica* de donde surgen el resto de los haplotipos obtenidos (Figura 12).

El análisis de secuencias para las poblaciones del linaje de *Gila eremica* en la cuenca del Río Sonora mostró índices de diversidad de gen de 0.8719 (+/- 0.0372) y un valor de diversidad de nucleótido de 0.004004 (+/- 0.002279) para los individuos del Río Bacanuchi en el Vado de Tahuichopa. Las secuencias analizadas para la cuenca del Río Bacanuchi al Sur del poblado de Bacanuchi mostraron valores de diversidad de gen y nucleótido de 0.9100 (+/-0.0350) y 0.004266 (+/-0.002423) respectivamente. Para la subcuenca Río Bacoachi en el Arroyo Chinapa los índices de diversidad de gen y de nucleótido mostraron valores de 0.8621 (+/- 0.0411) y 0.003502 (+/- 0.002028) respectivamente. Las secuencias para las muestras de la subcuenca del Río San Miguel indicaron valores de 0.9109 (+/- 0.0253) para la diversidad de gen y 0.003040 (+/- 0.001790) para diversidad de nucleótido. Los valores de diversidad de gen y nucleótido para todas las poblaciones en conjunto de la

cuenca del Río Sonora fueron de 0.9107 (+/- 0.0129) y 0.003748 (+/- 0.002095) respectivamente.

Con lo que respecta a los individuos analizados para la cuenca del Río Mátape, las secuencias para la población de la subcuenca del Río Mátape mostraron valores de diversidad de gen y nucleótido de 0.4214 (+/- 0.0982) y 0.000476 (+/- 0.000464) respectivamente. Las poblaciones para *Gila* cf. *eremica* del Arroyo El Tigre en el Cañón La Balandrona mostraron valores de diversidad de gen y nucleótido de 0.5161 (+/- 0.0225) y 0.000493 (+/- 0.000474) respectivamente, mientras que *G.* cf. *eremica* del Arroyo El Tigre en el Cañón La Pirinola tuvo valores de 0.4335 (+/- 0.1048) para diversidad de gen y 0.002715 (+/- 0.001634) para diversidad de nucleótido.

Los índices de diversidad molecular mostraron valores muy similares al interior de las poblaciones de la cuenca del Río Sonora y este patrón fue detectado para las poblaciones de la cuenca del Río Mátape, sin embargo los individuos del Cañón La Pirinola resultaron ser más diversos en comparación a las otras dos poblaciones de la cuenca (Tabla 9).

Tabla 8. Distribución de las frecuencias haplotípicas de las siete poblaciones del linaje de *G. eremica* analizadas. H = haplotipos.

H	Cuenca del Río Sonora			Cuenca del Río Mátape			
	Vado de Tahuichopa	Subcuenca Río Bacanuchi	Arroyo Chinapa	Subcuenca Río San Miguel	Subcuenca Río Mátape	Cañón La Balandrona	Cañón La Pirinola
1			1				
2	6	4	2	2			
3				1			
4				3			
5				1			
6			1				
7	2	2	4				
8	2	3	4				
9	2	1					
10				1			
11	2	2	1				
12		1	2				
13	8	6	6	5			
14	2	1	1				
15		2					
16				1			
17				2			
18				2			
19			1				
20				1			
21				2			
22	3	1		6			
23		1		7			
24	2	1	2	1			
25							1
26							24
27							3
28						16	2
29						16	2
30					1		
31					5		
32					24		
33					2		

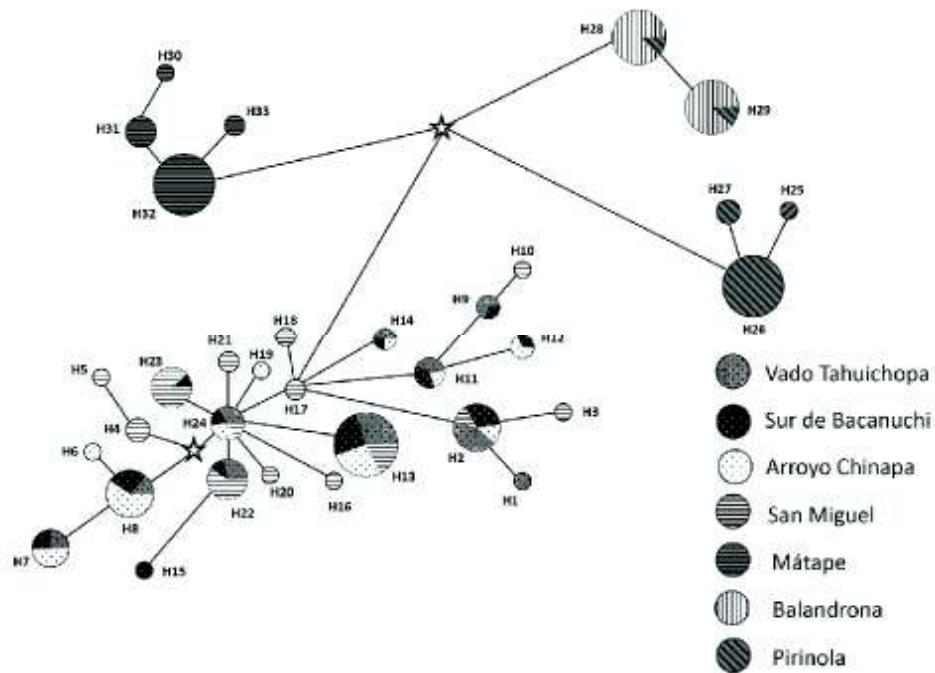


Figura 12. Perfil de red haplotípica del gen *ND2* para las poblaciones del linaje de *G. eremica*. El tamaño de los círculos es proporcional a los organismos que presentaron el haplotipo mostrado. Las estrellas representan el median vector que separa a los haplogrupos resueltos. La línea que une a los haplotipos es proporcional a los pasos mutacionales.

Tabla 9. Índices de diversidad molecular para las siete poblaciones del linaje de *G. eremica* analizadas. Ts = transiciones Tv = transversiones, Sus = Sustituciones, Spr = Sitios privados, Spo = Sitios polimórficos.

Localidad\Índice	Número de				
	Ts	Tv	Sus	Spr	Spo
Vado de Tahuichopa	15	1	16	0	16
Subcuenca Río Bacanuchi	19	1	20	1	20
Arroyo Chinapa	15	1	16	2	16
Subcuenca Río San Miguel	20	2	22	9	22
Subcuenca Río Mátape	2	1	3	2	3
Cañón La Balandrona	1	0	1	0	1
Cañón La Pirinola	12	2	14	12	14

El análisis molecular de varianza (AMOVA) para las siete poblaciones en conjunto explico el 78.17 % de la variación entre las poblaciones y el 21. 83 % dentro de las poblaciones e indicó una *Fst* de 0.781 ($p = 0.0000$) (Tabla 10) con un número de migrantes por generación (*Nem*) de 0.15. Los valores de *Fst* en el análisis pareado de todas las poblaciones del linaje *G. eremica*, mostraron a las cuatro poblaciones de de la cuenca del Río Sonora con un grado de pequeño (0 - 0.05) a moderado (0.05 - 0.15) de diferenciación genética y un alto *Nem* (Tablas 11 y 12) lo que sugiere la presencia de flujo genético entre ellas. Las tres poblaciones analizadas para la cuenca del Río Mátape mostraron un alto grado de diferenciación genética (> 0.25) y un *Nem* menor a uno entre ellas y también contra las cuatro poblaciones de la cuenca del Río Sonora (Tablas 11 y 12). Los resultados indican un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones. Adicionalmente los valores de *Fst* y *Nem* sugieren un alto grado de diferenciación genética al interior de las poblaciones de la cuenca del Río Mátape y estas contra las poblaciones de la cuenca del Río Sonora.

Tabla 10. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las siete poblaciones en conjunto del linaje de *G. eremica*.

Fuente de la variación	GL	Suma de cuadrados	Varianza en los componentes	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	892.918	4.80878	78.17
Dentro de las poblaciones	208	279.352	1.34304	21.83
Total	214	1172.270	6.15181	

$F_{st} = 0.78168$ ($p = 0.0000$)

Tabla 11. Índices pareados de diferenciación genética (F_{st}) para las siete poblaciones del linaje de *G. eremica*. El asterisco (*) indica $P < 0.05$.

	Vado de Tahuichopa	Bacanuchi	Chinapa	San Miguel	Mátape	Balandrona	Pirinola
Vado de Tahuichopa	0						
Bacanuchi	0.028	0					
Chinapa	0.046*	0.015	0				
San Miguel	0.033	0.019	0.099*	0			
Mátape	0.852*	0.845*	0.871*	0.881*	0		
Balandrona	0.853*	0.847*	0.872*	0.882*	0.942*	0	
Pirinola	0.806*	0.8018*	0.825*	0.832*	0.849*	0.836*	0

Tabla 12. Número de migrantes pareados calculados por F_{st} para las siete poblaciones del linaje de *G. eremica*.

	Vado de Tahuichopa	Bacanuchi	Chinapa	San Miguel	Mátape	Balandrona	Pirinola
Vado de Tahuichopa	0						
Bacanuchi	16.873	0					
Chinapa	10.147	31.125	0				
San Miguel	14.619	24.906	4.508	0			
Mátape	0.086	0.091	0.073	0.067	0		
Balandrona	0.085	0.089	0.072	0.066	0.030	0	
Pirinola	0.119	0.123	0.106	0.100	0.088	0.097	0

El análisis jerárquico de varianza molecular para las tres regiones analizadas (cuenca del Río Sonora, sub-cuenca del Río Mátape y sub-cuenca del Arroyo El Tigre) indicó que el 67.63 % ($F_{st} = 0.82877$, $p = 0.0000$) de la variación ocurre entre los grupos, el 15.25 %

entre las poblaciones al interior de los grupos ($F_{sc} = 0.47107$, $p = 0.0000$) y 17.12% ($F_{ct} = 0.676$, $p = 0.0000$) dentro de las poblaciones (Tabla 13). Los valores de F_{st} en el análisis pareado para los tres grupos de las poblaciones del linaje mostraron un alto grado de diferenciación genética (> 0.25) (Tablas 14 y 15) con un bajo Nem entre ellas (Tablas 14 y 15). Al igual que para las siete poblaciones en conjunto, los resultados indican un alto nivel de variabilidad genética entre las poblaciones con un alto grado de diferenciación genética entre ellas.

Tabla 13. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de *Gila eremica*.

Fuente de la variación	GL	Suma de cuadrados	Varianza en los componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	17.406	5.30445	67.63
Entre poblaciones dentro de los grupos	4	82.622	1.19614	15.25
Dentro de las poblaciones	208	279.352	1.34304	17.12
Total	214	1172.270	7.84363	
$F_{st} = 0.828$ ($p = 0.0000$)				
$F_{sc} = 0.471$ ($p = 0.0000$)				
$F_{ct} = 0.676$ ($p = 0.02542$)				

Tabla 14. Índices de diferenciación genética (F_{st}) pareados para los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de *Gila eremica*. El asterisco (*) indica $P < 0.05$.

	Sonora	Mátape	Arroyo El Tigre
Sonora	0		
Mátape	0.861*	0	
Arroyo El Tigre	0.710*	0.671*	0

Tabla 15. Número de migrantes por generación (Nem) pareados calculados por F_{st} para los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de *Gila eremica*.

	Sonora	Mátape	Arroyo El Tigre
Sonora	0		
Mátape	0.080	0	
Arroyo El Tigre	0.203	0.244	0

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Eventos relacionados con la especiación de ciprínidos en Norte América

Gran parte de la diversidad de ciprínidos en el Suroeste de EUA y el Norte de México fue aparentemente causada por fenómenos hidrológicos promovidos por diversos eventos geológicos transcurridos en el Mioceno (~23.7-5.3 Ma) (Smith y Miller, 1986; Mayden *et al.*, 1992; Schönhuth *et al.*, 2006, 2011, 2014, 2015). Los eventos tectónicos y magmáticos durante la subducción de la Placa de Farallón debajo de la Placa de Norte América provocaron la formación de la Sierra Madre Occidental (SMO) y aparentemente la configuración de los principales drenajes en el Suroeste de EUA y el Noroeste de México durante el Oligoceno y Mioceno (~36-5.3 Ma) (Miller y Smith, 1986; Ferrari *et al.*, 1999, 2005; Minckley y Marsh, 2009). De acuerdo con varios autores, el incremento en volumen y área de la SMO iniciaron la formación de un antiguo sistema del Río Grande que en algún momento conectó varios drenajes actualmente independientes en el Norte de México (Smith y Miller, 1986; Mayden *et al.*, 1992; Galloway *et al.*, 2011; Schönhuth *et al.*, 2006, 2011, 2014, 2015). La distribución actual de diversos linajes de ciprínidos en ambos lados de la línea divisoria continental apoya la hipótesis de un ancestral sistema del Río Grande que fue fragmentado debido a eventos tectónicos y magmáticos y al incremento de la aridez en la región durante el Mioceno (Schönhuth *et al.*, 2006, 2011, 2014, 2015). Posterior al desarrollo de la SMO la corteza continental en el Noroeste de México y Suroeste de EUA fue adelgazada por procesos de falla y extensión en el Oligoceno tardío (~27 Ma) y dieron lugar a la formación de la provincia extensional de cuencas y sierras (Lo que en inglés se conoce como “Basin and range extensional province”) (Scarborough y Brusca, 2015).

De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2014), los patrones de distribución de varias especies de ciprínidos y las relaciones filogenéticas inferidas para el linaje de *Gila* sugieren que las principales áreas de diversificación del género son los tributarios del antiguo sistema del Río Grande en el Desierto de Chihuahua, los drenajes del Río Colorado y los drenajes con

vertiente al Océano Pacífico. La presencia de endemismos por cuenca hidrológica y aparente monofilia de varios linajes de *Gila* en México (Schönhuth *et al.*, 2014) sugieren un proceso de especiación alopátrico predicho por el Modelo I de vicarianza (separación geográfica) (Wiley, 1981) que fue promovido por la fragmentación del antiguo sistema del Río Grande. Este patrón resulta ser distinto para las especies del complejo *robusta* del Río Colorado donde varias especies presentan distribución simpátrica (Schönhuth *et al.*, 2014).

El género *Gila* resulta un grupo de peces taxonómicamente muy complejo que requiere ser analizado más a detalle. Los distintos patrones de especiación detectados para sus linajes, así como los recientes descubrimientos de poblaciones desconocidas (Varela-Romero, 2001; Schönhuth *et al.*, 2014) y los debates de clasificación taxonómica para algunos miembros del complejo *robusta* en el Río Colorado (Minckley y DeMarais, 2000; Brandenburg *et al.*, 2015; Carter *et al.*, 2016) indican la necesidad de realizar más estudios enfocados al conocimiento de la evolución y diversidad del género tanto en México como en EUA.

El registro de poblaciones de *Gila* en la Sierra El Aguaje al Sur de Sonora, México aisladas del resto de las conocidas para el género, representa el primer registro de especies del género *Gila* en pozas de cañones subtropicales de baja elevación (Varela-Romero, 2001; Bogan *et al.*, 2014) y corrobora su capacidad de adaptación del género a distintos ambientes (Douglas *et al.*, 2001; Schierenbeck, 2014; Dowling *et al.*, 2015). La localización geográfica de estas poblaciones en el Arroyo El Tigre al interior del sistema hidrológico del Río Mátape sugiere considerarlas como miembros del linaje de *G. eremica*, por lo que hasta el momento han sido asignadas como *Gila cf. eremica*.

Hasta hace algunos años la carpa del desierto fue confundida con la carpa Yaqui *G. purpurea*. La similitud morfológica entre estos cirpínidos y su rango de distribución provocaron que originalmente fueran consideradas como una sola especie. Los análisis morfológicos realizados por DeMarais (1991) entre poblaciones de *Gila* de distintas vertientes en las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y Yaquí demostraron diferencias morfológicas entre ellas. Los resultados de DeMarais (1991) sugirieron a las poblaciones de *Gila* de las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y la subcuenca del Río Moctezuma-Nacozari en el alto Río Bavispe como una especie distinta de la *Gila purpurea* del Arroyo San Bernardino de la cuenca del Río

Yaqui. A partir del estudio de DeMarais (1991), las poblaciones de *Gila* de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape fueron nombradas formalmente como *Gila eremica*. Los análisis genéticos posteriores corroboraron a *G. eremica* y *G. purpurea* como dos especies independientes pero filogenéticamente muy relacionadas (Schönhuth *et al.*, 2012, 2014). La cercana relación de estas especies y su localización geográfica han sugerido un evento de especiación de tipo peripátrico donde aparentemente una derivó de la otra (Schönhuth *et al.*, 2014).

VI.2. Evidencia de morfotipos al interior de *Gila eremica*

El análisis taxonómico tradicional realizado en este estudio para caracterizar morfológicamente las poblaciones de *G. eremica* en Sonora y otros congéneres nativos para el Estado mostraron un alto grado de discriminación entre los taxa analizados. Los resultados corroboraron semejanza morfológica entre *G. eremica* nominal y *G. purpurea* que concuerda con lo reportado por DeMarais (1991). Las poblaciones recientemente registradas de *G. cf. eremica* en los cañones La Balandrona y La Pirinola de la subcuenca del Arroyo El Tigre fueron resueltas como una unidad morfológica y no revelaron diferencias entre ellas. Los resultados mostraron a *Gila cf. eremica* como morfológicamente más divergente de *G. eremica* nominal en comparación de *G. purpurea* y los otros integrantes del género *Gila* analizados. Nuestros resultados morfológicos indicaron distintas características somáticas que revelaron un cuerpo más delgado para *G. cf. eremica* en comparación de *G. eremica* nominal y adicionalmente se observaron diferencias merísticas de un mayor número de escamas en la línea lateral y un menor número de radios en la aleta pectoral para *G. cf. eremica* con respecto a *G. eremica* nominal. Lo anterior demuestra que *G. cf. eremica* puede ser diferenciada de *G. eremica* nominal a partir de dos caracteres merísticos. Esto último no resulta aplicable para diferenciar a *G. eremica* de *G. purpurea* debido a que ambas especies no presentan diferencias merísticas entre sí (DeMarais, 1991). Con respecto a lo anterior *G. cf. eremica* se reveló como una unidad morfológica distinta de *G. eremica* nominal. Las variaciones morfológicas y merísticas detectadas para *G. cf. eremica* pudieran representar un ejemplo de variación clinal (Huxley, 1938) como respuesta a la plasticidad del género para adaptarse a distintos ambientes

(Hubbs, 1940), por lo que *G. cf. eremica* pudiera ser considerada como una variante morfológica al interior del linaje de *G. eremica*. La localización geográfica de la subcuenca del Arroyo El Tigre adyacente a la Sierra Santa Úrsula puede sugerir que el origen de estas montañas volcánicas (~23-8 Millones de años atrás, Mora-Álvarez y McDowell, 2000) provocaron la desconexión del Arroyo El Tigre de la subcuenca del Río Mátape. Este tipo de eventos de aislamiento geográfico entre poblaciones han sido considerado como causa de vicarianza y posteriores eventos de especiación entre cyprinidos (Schönhuth *et al.*, 2006, 2011, 2014, 2015). Por lo tanto las diferencias morfológicas detectadas entre *G. cf. eremica* y *G. eremica* pueden ser atribuidas a un evento de especiación de tipo peripátrico al interior del linaje de *G. eremica*, como ha sido sugerido entre *G. eremica* y *G. purpurea* (Schönhuth *et al.*, 2014).

VI.3. Filogenia y divergencia genética de linajes al interior de *Gila eremica*

La filogenia mitocondrial y divergencia de secuencias obtenido por Schönhuth *et al.* (2014) resolvió las relaciones filogenéticas de las especies de *Gila* en México, incluyendo un linaje que comprende todas las especies nominales que habitan la región del Desierto de Chihuahua, denominado como el Grupo del Desierto de Chihuahua. El resto de las especies nominales presentes en México, *G. ditaenia*, *G. minacae*, *G. eremica* y *G. purpurea*, fueron resueltas como linajes independientes y recíprocamente monofiléticos dentro de *Gila*, pero no relacionados con el Grupo del Desierto Chihuahua (Schönhuth *et al.*, 2014). La monofilia del linaje de *G. eremica* (cuencas de los ríos Sonora y Mátape) y *G. purpurea* (Río Bavispe en las cabeceras de la cuenca del Río Yaqui) obtenida en el presente estudio fue altamente apoyada por los criterios ML e IB, como fue sugerido previamente mediante análisis morfológicos (DeMarais, 1991) y datos moleculares (Schönhuth *et al.*, 2014).

Las relaciones filogenéticas por los criterios de ML e IB utilizando el gen *Cyt-b* individualmente y el conjunto concatenado de los genes *Cyt-b*, *ND2* y *COXI* inferidas en el presente estudio soporta con altos valores de probabilidades posteriores, la monofilia del linaje de *G. eremica* e indica un antepasado común para todas sus miembros analizados. La

monofilia recíproca, los clados geográficos y la baja divergencia genética detectada dentro del linaje de *G. eremica* pueden explicarse por aislamientos relativamente recientes de drenajes que una vez estuvieron conectados y habitados por los miembros de este linaje, como se sugiere para otras especies nominales de *Gila* que se producen en México (Schönhuth *et al.*, 2014). Adicionalmente, los análisis filogenéticos evidencian la existencia de dos clados geográficos monofiléticos para las cuencas de Sonora y Mátape, con altos soportes tanto para el criterio de ML como para IB.

La estrecha relación y la baja divergencia genética entre *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape y *G. cf. eremica* de la subcuenca de Arroyo El Tigre detectadas en nuestro análisis con el gen *Cyt-b* sugieren un ancestro en común para esas poblaciones e indica una conexión relativamente reciente entre ambas subcuencas. Por otra parte los análisis filogenéticos apoyan a *G. cf. eremica* como un clado de identidad específica, independiente de otros miembros del linaje, pero estrechamente relacionado con las poblaciones de *G. eremica* en la subcuenca del Río Mátape. A pesar de que la subcuenca del Arroyo El Tigre forma parte del sistema hidrológico de la cuenca del Río Mátape, ésta no tiene conexión con el cauce principal del Río Mátape, promoviendo que las dos poblaciones de *G. cf. eremica* estén geográficamente aisladas de las existentes en el resto de la cuenca.

La identidad específica del clado de *G. cf. eremica*, junto con su aislamiento geográfico y los resultados de los análisis morfométricos y merísticos dentro del linaje de *G. eremica*, dan más sustento para considerar a *G. cf. eremica* como una unidad evolutiva independiente de *G. eremica*. Los datos filogenéticos presentados aquí también sugieren a *G. cf. eremica* como el pariente más cercano de *G. eremica*, con *G. purpurea* como el clado hermano de ese linaje.

La localización geográfica y monofilia entre el linaje de *G. eremica* y *G. purpurea* sugieren un evento de divergencia causado por aislamiento geográfico que promovió una especiación de tipo peripátrica (Wiley, 1981; Schönhuth *et al.*, 2014). El tiempo de divergencia de 15.60 Ma (~20.42-12.91 Ma) estimado entre estos dos linajes por el reloj molecular puede sugerir uno o varios eventos de fragmentación hidrológica durante el Mioceno medio o Mioceno temprano entre las cuencas de los ríos Sonora, Mátape y Yaqui durante esa época (Figura 13). Hendrickson *et al.* (1981) atribuyen al clima árido como una

posible causa de desconexión entre las tres cuencas. Adicionalmente el incremento en la aridez regional ha sido asociado como un factor para el aislamiento de la biodiversidad en el Desierto de Sonora (Van Devender, 2000).

La presencia de poblaciones de *G. eremica* en las cuencas de los ríos Sonora y Mátape indican una antigua conexión entre ambos drenajes. La posición geográfica de estas cuencas sugiere al levantamiento de la Sierra de Mazatán (Vega-Granillo, 1992) (Figura 13) como una posible causa de desconexión entre ellas. La Sierra de Mazatán pertenece al “complejo de núcleo metamórfico” (Coney, 1979; Crittenden *et al.*, 1980), un conjunto de estructuras en forma de domo con un metamorfismo dinámico relacionado al evento extensional de la provincia de cuencas y sierras durante el Mioceno (Wong y Gans, 2008; Calmus *et al.*, 2011). El dato estimado para la divergencia de las poblaciones de *G. eremica* de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape durante el Mioceno medio sugiere que la desconexión entre estas cuencas puede estar relacionada al levantamiento final de la Sierra de Mazatán en el Mioceno Medio hace ~12.4 Ma (Figura 13) (Wong y Gans, 2008).

Las poblaciones de *G. cf. eremica* en los cañones La Balandrona y La Pirinola habitan estanques naturales conectados entre sí por un arroyo perteneciente a la subcuenca del Arroyo El Tigre que drena a través de la Sierra El Aguaje y desemboca de manera independiente en el Estero El Rancho. La Sierra El Aguaje se encuentra cerca del Golfo de California y es contigua a la porción más sureña de la provincia extensional de cuencas y sierras (King, 1939; Raisz, 1964; McPhee, 1981; Figura 13). Los estudios geológicos en la Sierra Santa Úrsula adyacente a la Sierra El Aguaje han datado (K-Ar) el emplazamiento de rocas volcánicas entre ~23,5 y 8,5 Ma. Las fechas más antiguas son consideradas como resultado del magmatismo de arco subductivo que dio lugar a la formación de la Provincia Extensional del Golfo de California (Stock y Hodges, 1989; Mora-Álvarez y McDowell, 2000; Roldán-Quintana *et al.*, 2004; Figura 13), mientras que las fechas más recientes (~10,3-8,5 Ma) están representadas por corrientes de lava máfica emplazadas durante las primeras etapas de rifting que finalmente condujeron a la apertura del Golfo de California (Mora-Álvarez y McDowell, 2000).

La cercana relación filogenética de *G. cf. eremica* con *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape y el bajo grado de divergencia genética detectado entre sus poblaciones sugieren

una reciente desconexión entre la subcuenca del Arroyo El Tigre y la subcuenca del Río Mátape. Al igual que otras especies de *Gila* para México el aislamiento geográfico de *G. cf. eremica* puede ser atribuido a distintos fenómenos hidrológicos promovidos por eventos geológicos durante el Mioceno (Schönhuth *et al.*, 2014, 2015). La localización geográfica del Arroyo El Tigre y el tiempo de divergencia de 5.60 Ma (~11.03-2.37 Ma) estimado mediante el reloj molecular relajado sugieren que su desconexión con la subcuenca del Río Mátape posiblemente fue promovida por los eventos volcánicos en la Sierra Santa Úrsula posteriores a la formación de la Provincia Extensional del Golfo de California durante el Mioceno medio (Stock y Hodges, 1989; Mora-Álvarez y McDowell, 2000; Roldán-Quintana *et al.*, 2004).

Los oasis subtropicales de los cañones de las montañas de la Sierra El Aguaje donde *G. cf. eremica* habita proveen hábitats con agua limpia y amplia protección contra las extremas oscilaciones de temperatura de la región. Los oasis de los cañones La Balandrona y La Pirinola representan microhábitats aislados que sostienen ecosistemas relictos con afinidades mesíticas subtropicales (Búrquez *et al.*, 1999; Felger, 1999; Bogan *et al.*, 2014). Aparentemente estos oasis tuvieron sus orígenes en el Holoceno (~8.000 años atrás) durante la transformación de un ambiente mesico a un ambiente xérico en el actual desierto de Sonora (Axelrod, 1948, 1979; Grismer y McGuire, 1993). Muchas de las tobas volcánicas e ignimbritas soldadas de la zona resultan bastante porosas, con una gran cantidad de zonas de contacto suficientemente agrietadas y erosionadas para permitir el desarrollo de cañones con pozas alimentadas por manantiales (Búrquez *et al.*, 1999; Bogan *et al.*, 2014). De acuerdo con los datos obtenidos por nuestro reloj molecular, el cálculo de 5.60 Ma (~11.03-2.37 Ma) de aislamiento de *G. cf. eremica* en los cañones de la Sierra El Aguaje aparentemente coincide con una transición regional de condiciones tropicales a condiciones más secas durante el Mioceno tardío o Plioceno temprano (Van Devender, 2000).

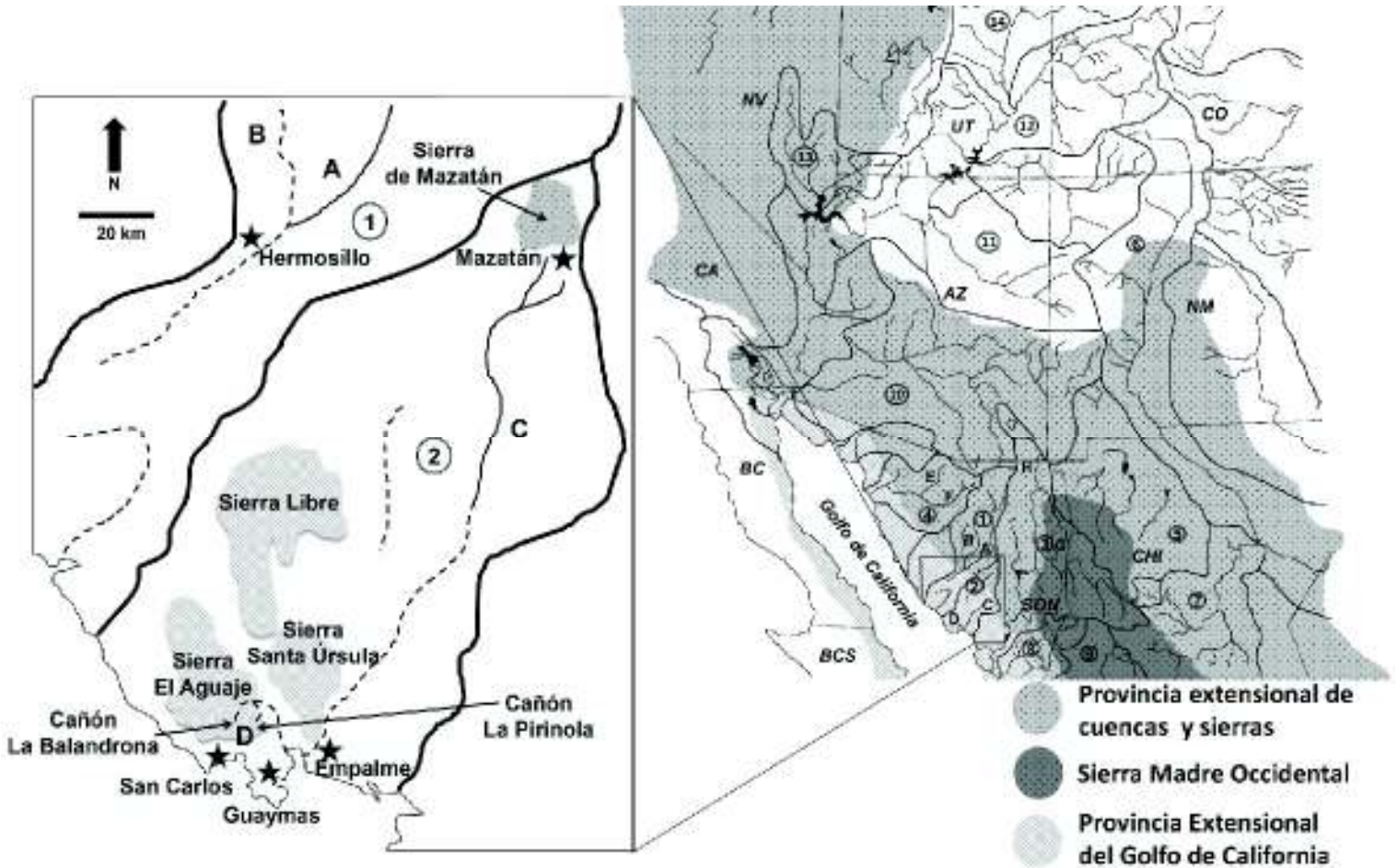


Figura 13. Principales cuencas hidrológicas y provincias fisiográficas en el Noroeste de México y Suroeste de EUA. El mapa desplegado indica las principales áreas de estudio. Los mapas fueron modificados de Stock y Hodges (1989), Mora-Álvarez y McDowell (2000) Roldán-Quintana *et al.* (2004) y Minckley y Marsh (2009). Los límites de las cuencas hidrológicas están representados por líneas gruesas. Las líneas discontinuas indican flujos intermitentes. Los nombres en los círculos indican cuencas/subcuencas hidrológicas y las letras indican ríos o arroyos: 1 Cuenca Río Sonora, 2 Cuenca Río Mátape, 3 Cuenca Río Yaqui, 4 Cuenca Río De la Concepción, 5 Cuenca Río Mimbres-Casas Grandes, 6 Cuenca Río Grande (Bravo), 7 Cuenca Río Conchos, 8 Cuenca Río Mayo, 9 Cuenca Río Fuerte, 10 Subcuenca Río Gila, 11 Cuenca Pequeño Río Colorado, 12 Cuenca Río Colorado, 13 Cuenca Ríos Moapa-Virgin-White, 14 Subcuenca Río Green. A = Subcuenca Río Sonora, B = Subcuenca Río San Miguel, C = Subcuenca Río Mátape, D = Arroyo El Tigre, E = Subcuenca Río Altar, F = Subcuenca Río Magdalena, G = Arroyo El Largo en la subcuenca del Río Bavispe, H = Arroyo San Bernardino en la subcuenca del Río Bavispe.

VI.4. Caracteres diagnósticos para la discriminación de linajes de *Gila eremica*

La técnica de códigos de barras de ADN se ha utilizado anteriormente para identificar peces a un nivel específico y revelar la presencia de diversidad críptica desconocida (Lara *et al.*, 2010; April *et al.*, 2011). Las inconsistencias genéticas obtenidas por April *et al.* (2011) revelaron linajes evolutivos independientes al interior de especies nominales, lo que sugirió la presencia de una diversidad morfológica críptica desconocida de peces en Norteamérica. El análisis de código de barras basado en distancias genéticas ha demostrado resultados positivos para la discriminación de peces y ha sugerido la presencia de diversidad críptica (Lara *et al.*, 2010; April *et al.*, 2011). Sin embargo, el enfoque tradicional de distancias genéticas con Kimura 2 parámetros (K2P) utilizado aquí reveló una distancia muy pequeña entre *G. cf. eremica* y *G. eremica* nominal, lo que no hizo posible una discriminación de especies mediante este enfoque.

El enfoque basado en caracteres con el análisis CAOS ha sido exitosamente utilizado para definir códigos de barras para especies (Rach *et al.*, 2008; Jörger y Schrödl, 2013). Al igual que en la taxonomía tradicional, la identificación de especies por el código de barras por el método de CAOS se basa en la premisa de que miembros de un grupo taxonómico comparten atributos característicos (e.g. nucleótidos diagnósticos putativos) que no se encuentran en otros grupos relacionados (Rach *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Jörger y Schrödl, 2013). Este enfoque basado en caracteres para asignar códigos de barras reveló en el presente estudio caracteres diagnósticos moleculares (polimorfismos) que permiten la discriminación de *G. cf. eremica* de *G. eremica* nominal y de *G. purpurea*, la especie más cercana al linaje. A pesar de que existe la propuesta de la existencia de más de tres caracteres diagnósticos como una brecha de código de barras para separar grupos taxonómicos (Rach *et al.*, 2008), Jörger y Schrödl (2013) consideran que CAOS no posee por sí mismo un criterio objetivo para delimitar una brecha de código de barras del ADN. El análisis CAOS no determina una cantidad distinguible de nucleótidos que puedan indicar un límite de especies, u otros niveles taxonómicos. Lo anterior sustenta que la presencia de un solo cambio distinguible en las secuencias de *G. cf. eremica* comparado con las secuencias de *G. eremica* nominal puede ser considerado como un criterio válido para discriminarlas. Por otra parte, la

suposición de que un atributo característico (AC) ha sido fijado al interior de una población se vuelve más confiable con un mayor número de muestras analizadas (Rach *et al.*, 2008). De acuerdo a Zhang *et al.* (2010) el número de muestras necesario para considerar al código de barras como confiable debe tener un rango de 9.5 a 216.6. El número de muestras analizadas aquí para el código de barras del linaje de *G. eremica* resulta estar dentro del rango propuesto por Zhang *et al.* (2010). Los resultados del código de barras obtenidos en el presente estudio revelaron un polimorfismo fijo en las 29 secuencias de *G. cf. eremica* que no fue detectado en ninguna de las secuencias de las poblaciones de *G. eremica* nominal. El polimorfismo detectado en *G. cf. eremica* representa un atributo característico puro que sólo se encuentra en ese grupo (Autapomorfía o Autoapomorfía) e indica un patrón de variación genético distinto para *G. cf. eremica* contra *G. eremica* nominal y *G. purpurea*.

El proceso de identificación de especies a través del código de barras del ADN ha sido en ocasiones confundido con el descubrimiento de especies (DeSalle, 2006). La aplicación del código de barras del ADN para la identificación de especies ha sido considerada como correcta ya que su uso no se basa en un concepto de especie (Rach *et al.*, 2008). Esto último es debido a que la identificación de especies con el código de barras del ADN es consistente con cualquier concepto utilizado por un taxónomo al momento de identificar una especie conocida. Sin embargo, el descubrimiento de especies resulta un trabajo más complicado debido a que requiere un concepto de especie aunado a un sistema de corroboración basado en taxonomía tradicional (DeSalle *et al.*, 2005). De acuerdo con lo anterior, una sola fuente de datos como lo son los moleculares, morfológicos, ecológicos o etológicos no es válida para el descubrimiento de especies (Rach *et al.*, 2008).

El enfoque de CAOS para el código de barras del ADN es considerado como un método válido para probar límites entre especies, sin embargo, este método requiere una clasificación previa para los grupos a analizar, lo que lo hace incapaz de un descubrimiento de especies (Jörger y Schrödl, 2013). Los resultados del código de barras del ADN aunados a los datos para la morfología e inferencia filogenética obtenidos a lo largo de este estudio apoyan a *G. cf. eremica* como una unidad evolutiva independiente de *G. eremica* nominal.

VI.5. Variabilidad genética al interior de los linajes de *Gila eremica*

La distribución de frecuencias haplotípicas del gen mitocondrial *ND2* para las poblaciones del linaje de *G. eremica* analizadas en nuestro estudio mostraron una gran cantidad de haplotipos compartidos entre las poblaciones de la cuenca del Río Sonora. Al interior de la cuenca del Río Mátape los haplotipos determinados para la subcuenca del Río Mátape fueron exclusivos para esa localidad. Adicionalmente se detectaron haplotipos compartidos entre las poblaciones de los cañones La Balandrona y La Pirinola. El perfil de redes haplotípicas mostró las relaciones entre los diferentes haplotipos y determinó un haplotipo basal que estuvo presente para las cuatro localidades del Río Sonora. Por otra parte, este análisis reveló tres haplogrupos y evidenció que los haplotipos detectados para la cuenca del Río Mátape están mutacionalmente más alejados del haplotipo basal que los haplotipos de la cuenca del Río Sonora. La presencia de distintos haplogrupos ha sido también considerada anteriormente como evidencia de aislamiento entre poblaciones (George *et al.*, 2008).

Los análisis de diversidad de gen y nucleótido donde se evaluaron siete poblaciones en conjunto del linaje de *G. eremica* y otro donde estas siete fueron repartidas en tres grupos con afinidad geográfica mostraron valores muy similares al interior de las poblaciones de la cuenca del Río Sonora y al interior de la cuenca del Río Mátape. Los resultados adicionales indicaron valores distintos de diversidad de gen y nucleótido para las poblaciones de la cuenca del Río Sonora en contra de las poblaciones de la cuenca del Río Mátape. De la misma forma, Perdices *et al.* (2004) detectan valores bajos de diversidad nucleotídica y estructura poblacional en el análisis de *Zacco platypus* en la cuenca de Chang Jiang.

Los AMOVA donde las poblaciones fueron consideradas como siete y tres grupos mostraron el mismo patrón de resultados al indicar que el mayor porcentaje de la variación se encuentra entre los grupos analizados. Estos resultados aunados al bajo número de migrantes por generación entre los tres grupos geográficos y los elevados índices de diferenciación genética sugieren que no existe flujo genético entre ellos e indican grupos genéticamente diferenciados. Los índices de diferenciación genética en el análisis pareado de las cuatro poblaciones de la cuenca del Río Sonora mostraron valores moderados ($F_{st} < 0.09$) con un

número de migrantes por generación elevado ($Nem > 4$). Los resultados anteriores no demuestran divergencia genética entre las poblaciones analizadas para la cuenca del Río Sonora. Adicionalmente, el elevado número de migrantes por generación sugiere que no existen barreras geográficas que interrumpan el flujo de genes entre sus poblaciones. Al interior de la cuenca del Río Mátape los índices de diferenciación en el análisis pareado indicaron un alto grado de diferenciación genética entre ellas ($Fst > 0.8$) y valores de migrantes por generación menores a uno. Estos resultados sugieren un alto grado de estructura genética entre las poblaciones y sugieren que la deriva génica actúa independientemente para las poblaciones de *Gila cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre con respecto a las poblaciones de la *G. eremica* nominal en el resto de su distribución (Hartl, 1981; George *et al.*, 2008).

Diversos trabajos de variabilidad genética en peces a partir de datos mitocondriales sugieren que un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones es atribuible a diferenciación genética debido a un restringido flujo de genes. George *et al.* (2008) obtuvieron resultados similares a los nuestros al analizar cuatro poblaciones de *Cyprinella caerulea* en EUA a partir del gen *ND2* y atribuyeron sus resultados a diferenciación genética entre sus poblaciones. En otro estudio que involucra a peces, Echelle *et al.* (2000) indicaron que las diferencias de las poblaciones de *C. macularius* de Salton Sea y las del Delta del Río Colorado son explicadas por el 3.7% ($p < 0.05$) de variación entre ellas. A pesar de que el resultado de Echelle *et al.* (2000) entre esas dos poblaciones puede considerarse bajo, este fue estadísticamente significativa. Echelle *et al.* (2000) consideraron que sus resultados aunados a la historia de conexiones entre Salton Sea y el Delta del Río Colorado sustentan la necesidad de considerar un manejo independiente de ambas poblaciones. En otro análisis para 10 poblaciones de *Cyprinella gibbsi* en EUA se determinaron cuatro unidades de manejo para la especie debido a que sus poblaciones difirieron significativamente en frecuencias alélicas mitocondriales, lo que indicó un bajo grado de flujo genético entre ellas (Connelly *et al.*, 2006; Moritz, 1994a, b)

Para nuestro caso, los valores de variabilidad genética obtenidos sugieren un alto grado de diferenciación genética para las poblaciones del linaje de *G. eremica* y al igual que en el

caso de Echelle *et al.* (2000) y Connelly *et al.* (2006), las poblaciones de *Gila* de las cuencas de los ríos Sonora y Mátape y la subcuenca del Arroyo El Tigre pueden ser consideradas como unidades de manejo independiente. Los resultados del AMOVA, la presencia de haplotipos compartidos entre varias de las poblaciones del linaje de *G. eremica* y la evidencia filogenética del linaje pueden sugerir una reciente desconexión entre ellas.

VI.6. Análisis de las evidencias de la presencia de *Gila cf. eremica* como una nueva entidad evolutiva al interior del linaje de *Gila eremica*

La localización de las poblaciones de *Gila cf. eremica* aisladas por barreras geográficas de la *G. eremica* nominal sugiere que el linaje de *G. eremica* puede haber estado sujeto a un evento de vicarianza que produjo especiación al interior del linaje. Los eventos de vicarianza han sido una causa común de especiación alopátrica en peces dulceacuícolas (Coyne y Orr, 2004; Dawson y Hammer, 2008; Schönhuth *et al.*, 2014, 2015). La especiación alopátrica puede ocurrir cuando una población parental es dividida por el surgimiento de barreras físicas y consecuentemente genera subpoblaciones (Hedrick, 2005). La especiación en este caso ocurre debido a que las subpoblaciones son individualmente sujetas a distintas presiones selectivas como la selección natural o la deriva génica y sus frecuencias alélicas son alteradas de manera independiente. Con el paso del tiempo las subpoblaciones son sometidas a cambios morfológicos y fenotípicos lo que resulta en la formación de unidades discretas de distintos organismos que son considerados especies (Hedrick, 2005).

La definición de *Gila cf. eremica* como una especie independiente de *Gila eremica* puede ser sustentada por el concepto filogenético de especie. De acuerdo con este concepto, una especie es definida como un grupo de organismos que son diagnósticamente diferentes de otros grupos similares, son descendientes de un antepasado común y poseen una combinación de ciertos rasgos derivados dentro de los cuales hay un patrón de ascendencia-descendencia (Cracraft, 1989). Los resultados de este trabajo para la caracterización de las poblaciones de la carpa de desierto *G. eremica* obtenidos a lo largo de este estudio han revelado a *Gila cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre como una unidad biológica distinguible de *G.*

eremica nominal. La caracterización morfológica de las poblaciones de *G. cf. eremica* comparadas con las de *G. eremica* nominal, mostró características distintas entre ellas lo que concuerda con el concepto filogenético al referirse como grupos con caracteres diagnósticos distinguibles. Por otra parte, los análisis filogenéticos y el reloj molecular evidenciaron la relación ancestro-descendiente para *G. cf. eremica*. Los diferentes criterios filogenéticos revelaron un único ancestro en común para las poblaciones de *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre. Adicionalmente los análisis filogenéticos mostraron una relación muy cercana entre *G. cf. eremica* con las poblaciones de *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape. Este último resultado sugiere que las poblaciones de *G. cf. eremica* probablemente derivaron de un ancestro perteneciente a la subcuenca del Río Mátape.

El concepto evolutivo de especie de Wiley y Mayden (2000) también resulta aplicable a los resultados obtenidos en nuestro estudio. De acuerdo con estos autores una especie es una sola línea de poblaciones ancestro-descendientes que mantiene su identidad respecto a otras líneas y que mantiene sus propias tendencias evolutivas y destino histórico. Este concepto resulta coherente para nuestros resultados obtenidos por el código de barras del ADN basado en caracteres en el linaje de *Gila*. A partir de esa técnica fue posible detectar caracteres únicos en *G. cf. eremica* que estuvieron ausentes de sus grupos más cercanos. La discriminación de *G. cf. eremica* a partir de caracteres diagnósticos exclusivos (autapomorfías o autoapomorfías) revela sus tendencias evolutivas y demuestra identidad genética en contra de otros miembros del linaje de *Gila*.

Por otra parte, el concepto biológico de especie resulta útil para definir a *G. cf. eremica* como una especie independiente de *G. eremica* nominal. De acuerdo con Mayr (1942) una especie está conformada por poblaciones con capacidad real o potencial de entrecruzarse entre sí, que están aislados reproductivamente de otros grupos similares. La localización geográfica que ocupan las poblaciones de *G. cf. eremica* sugiere un evidente aislamiento reproductivo con respecto a las otras poblaciones del linaje de *G. eremica* y este resultado es corroborado por nuestros datos genéticos que revelaron ausencia de flujo genético entre ellas. Sin embargo, para las poblaciones de *G. cf. eremica* de los cañones, que se encuentran en apariencia reproductivamente aisladas por una discontinuidad en la unión de los flujos de agua entre los

cañones (arroyos intermitentes), ningún dato morfométrico ni evidencia molecular las discrimina, por lo que es posible considerarlas como la misma entidad biológica según los conceptos filogenético y evolutivo de especie (Crafrac, 1989; Wiley y Mayden, 2000). La falta de caracteres diagnósticos entre las dos poblaciones de *G. cf. eremica* sugieren que el tiempo de aislamiento reproductivo no ha sido suficiente para provocar divergencia entre ellas (Hedrick, 2005).

Las relaciones filogenéticas y los tiempos de divergencia estimados al interior del linaje de *G. eremica* son congruentes con la hipótesis propuesta por Schönhuth *et al.* (2014) de radiaciones rápidas resultando en breves períodos de divergencia o eventos de especiación dentro del linaje de *Gila*. De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2014) los eventos de especiación para *Gila* ocurrieron durante el Mioceno y fueron promovidos por distintos fenómenos hidrológicos relacionadas a episodios orogénicos y la aridez progresiva en el Noroeste de México y Suroeste de EUA (Miller y Smith, 1986; Minckley *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio para la caracterización de las poblaciones del linaje de *G. eremica* aunados a la aplicación de distintos conceptos de especie (Mayr, 1942; Cracraft, 1989; Wiley y Mayden, 2000) revelan a las poblaciones de *Gila* de la subcuenca del Arroyo El Tigre como una especie distinta y evolutivamente independiente de la especie nominal *Gila eremica*. El reconocimiento de esta nueva especie de *Gila* replantea la hipótesis de *Gila purpurea* como la especie hermana de *G. eremica*. La evidencia filogenética obtenida en nuestros análisis sustenta a la *Gila* de los cañones La Balandrona y La Pirinola como el grupo hermano de *G. eremica* y *G. purpurea* se muestra como la especie hermana del linaje integrado por estas dos especies. Adicionalmente, los resultados obtenidos aportan conocimiento para la sistemática, evolución e historia del linaje de *Gila*. El reconocimiento para la *Gila* de la subcuenca del Arroyo El Tigre en la Sierra el Aguaje como una nueva especie revela un microendemismo para el género en la región lo que implica en su descripción formal para reconocerla como una especie válida y desarrollar estrategias para su manejo y conservación.

VII. CONCLUSIONES

El análisis de función discriminante (AFD) por el protocolo de box-truss mostró un alto grado de discriminación entre las distintas poblaciones para *Gila* analizadas.

Las variables canónicas (Raíces) uno y dos del Análisis de función discriminante explicaron el 51.67 y en conjunto 72.36 % de la variación entre los taxa comparados con nueve variables principales para discriminar a los grupos.

El diagrama de dispersión del AFD mostró separado al grupo de *Gila* cf. *eremica* del Arroyo El Tigre de las demás especies de *Gila* nativas para Sonora.

El dendrograma para los diferentes Taxa agrupados por subcuencas mostró a las poblaciones de *Gila* cf. *eremica* de la subcuenca del Arroyo el Tigre (Subcuenca del Río Mátape) muy relacionadas con la población de *G. eremica* de la cuenca del Río Mátape y mostró al resto de las poblaciones de *G. eremica* muy relacionadas con *G. purpurea*.

La caracterización morfológica mostró 16 caracteres lineales y dos merísticos distintivos entre *G. cf. eremica* y *G. eremica*.

Los análisis de inferencia filogenética mostraron a *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre en una relación muy cercana con *G. eremica* de la cuenca del Río Mátape y sugieren que probablemente esta última mencionada dio origen a la primera y evidencia la relación ancestro descendente de *G. cf. eremica*.

Los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana para los distintos marcadores mitocondriales resolvieron dos clados hermanos definidos por *G. eremica* de la cuenca del Río Sonora y otro para las poblaciones de *G. eremica* de la cuenca del Río Mátape incluido *G. cf. eremica*, lo que evidencia monofilia y clados geográficos al interior de la especie.

El análisis del tiempo de divergencia resuelto por el reloj molecular sugiere que las poblaciones del linaje de *G. eremica* divergieron del linaje de *G. purpurea* hace ~15.60 Ma (20.42-12.91) durante el Mioceno medio y sugiere a la aridez regional de esa época como una posible barrera de interconexión entre las cuencas de los ríos, Yaqui, Sonora y Mátape.

El análisis del reloj molecular sugirió que las poblaciones de *G. eremica* de la cuenca del Río Sonora divergieron hace ~7.63Ma (13.36-3.85 Ma) de las poblaciones de la cuenca del Río Mátape y sugiere al levantamiento final de la Sierra de Mazatán (12.4 Ma) como la posible causa de desconexión entre estos sistemas hidrológicos.

Los datos del Reloj molecular sugieren que la divergencia entre las poblaciones de *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre y las de *G. eremica* de la subcuenca del Río Mátape ocurrió hace ~5.60 Ma (11.03-2.37) y apoya a la teoría de actividad volcánica relativamente reciente en la Sierra Santa Úrsula como una causa de desconexión entre los dos drenajes.

El tiempo de aislamiento de *G. cf. eremica* en los cañones de la Sierra El Aguaje aparentemente coincide con una transición regional de condiciones tropicales a condiciones más secas durante el Mioceno tardío o Plioceno temprano.

La técnica del código de barras del ADN mediante el análisis de atributos característicos, muestra caracteres únicos para discriminar a *G. cf. eremica* de sus grupos más cercanos y otros integrantes del género analizados.

El código de barras del ADN que discrimina a *G. cf. eremica* de *G. eremica* nominal es un polimorfismo fijo en la base 505 de su secuencias analizadas que representa una novedad evolutiva que no está presente en sus grupos más cercanos (autapomorfía o autoapomorfía).

Los análisis de distribución de frecuencias haplotípicas mostraron muchos haplotipos compartidos entre las poblaciones de *G. eremica* de la cuenca del Río Sonora que no fueron detectados para ninguna de las poblaciones de la cuenca del Río Mátape y además se detectaron haplotipos exclusivos para la subcuenca del Río Mátape.

Se detectaron cinco haplotipos para las dos poblaciones de *G. cf. eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre, sólo dos son compartidos entre ellas.

Los distintos análisis moleculares de varianza explicaron que el mayor porcentaje de variación ocurre entre las poblaciones del linaje *Gila eremica* y puede ser atribuido a diferenciación genética entre sus poblaciones.

Los índices de diferenciación genética y el número de migrantes por generación detectados entre los tres grupos geográficos de las poblaciones del linaje de *G. eremica* sugieren diferenciación genética entre ellas debido a un restringido flujo de genes por lo que deben considerarse un manejo independiente para cada una ellas.

Los resultados moleculares obtenidos por los distintos marcadores mitocondriales utilizados sugieren que el aislamiento entre las poblaciones de *G. cf. eremica* y las de *G. eremica* nominal pudo haber ocurrido recientemente en el Mioceno.

La evidencia filogenética obtenida sustenta a las poblaciones de *Gila cf. eremica* que habitan los cañones La Balandrona y La Pirinola como el grupo hermano de *G. eremica* y *G. purpurea* se muestra como la especie hermana del linaje integrado por estas dos especies.

La presencia de poblaciones pertenecientes al género *Gila* en la Sierra el Aguaje representa el primer registro para este género en cañones subtropicales de baja elevación y es la primera evidencia de la existencia de una especie microendémica para Sonora.

VIII. RECOMENDACIONES

Proponer a *Gila* cf. *eremica* de la subcuenca del Arroyo El Tigre como una nueva especie nominal y desarrollar su descripción.

Estudiar la biología de la nueva especie de *Gila* de la subcuenca del Arroyo El Tigre para generar conocimiento que apoye estrategias de manejo y conservación de la especie.

Desarrollar análisis de marcadores nucleares para las poblaciones de *Gila* del Arroyo El Tigre para corroborar sus relaciones evolutivas y variabilidad genética.

Desarrollar estrategias de metagenómicas para caracterizar los genomas nucleares y mitocondriales de esta especie microendémica de Sonora.

Monitoreo de las abundancias poblacionales y de las condiciones de los hábitats de ocupación de la especie en los cañones La Balandrona y La Pirinola para su caracterización.

Proponer un estatus de conservación de la especie de acuerdo al método de evaluación de riesgo de especies silvestres de México (MER) propuesto en la NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010.

Promover la restauración del hábitat y promoción de prácticas para el mantenimiento de los niveles de agua superficial en los hábitats acuáticos de los Cañones La Balandrona y La Pirinola.

Reinventariar la fauna de peces dulceacuícolas en el Noroeste de México con énfasis en los integrantes del género *Gila* y evaluar con precisión el estado de conservación de la diversidad de peces nativos del Noroeste de México.

IX. LITERATURA CITADA

- Anderson N. L., N. M. Parish, J. P. Richardson y T. W. Pearson. 1985. Comparison of African trypanosomes of different antigenic phenotypes, subspecies and life cycle stages by two-dimensional gel electrophoresis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16: 299–314.
- April, J., R. L. Mayden, R. H. Hanner y L. Bernatchez. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Science* 108: 10602-10607.
- Arnot, D. E., C. Roper y R. A. Bayoumi. 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61: 15–24.
- Adams, D. C. y F. J. Rohlf. 2000. Ecological character displacement in Plethodon: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 4106-4111.
- Adams, D. C., F. J. Rohlf y D. E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution." *It. Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Altschul, F., G. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Alves, M. J., H. Coelho, M. J. Collares-Pereira y M. M. Coelho. 2001. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaecypris hispanica*: importance for conservation. *Heredity* 87: 463- 473.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers natural history and evolution*. Chapman-Hall. New York, USA. 511.
- Axelrod, D. I. 1948. Climate and evolution in western North America during middle Pliocene time. *Evolution* 2: 127-144.
- Axelrod, D. I. 1979. Age and origin of the Sonoran Desert. *Calif. Acad. Sci. Occasional Papers* 132: 1-74.
- Baird, S. F. y C. F. Girard. 1853. Descriptions of some new fishes from the River Zuni. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 6: 368-369.
- Barbour, C. D. y R. R. Miller. 1978. A revision of the Mexican cyprinid fish genus *Algansea*. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology University of Michigan* 155: 1–72.
- Barlow, W. 1961. Causes and significance of morphological variation in the fishes. *Systematic Zoology* 10: 105-117.
- Bailey, R. M. 1956. A revised list of the fishes of Iowa, with keys for identification. 187–238 p. En: Harlan, J. R. y Speaker, E. B. (Eds.), *Iowa Fish and Fishing*. Iowa State Conservation Commission, Des Moines.
- Bailey, R. M. y T. Uyeno. 1964. Nomenclature of the blue chub and the tui chub, cyprinid fishes from western United States. *Copeia* 1: 238–239.
- Becker, S., R. Hanner y D. Steinke. 2011. Five years of FISH-BOL: brief status report. *Mitochondrial DNA* 22: 3–9.

- Bergmann, T., H. Hadrys, G. Breves y B. Schierwater. 2009. Character-based DNA barcoding: a superior tool for species classification. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 122: 446–450.
- Bogan, M. T., N. Noriega-Felix, S. L. Vidal-Aguilar, L. T. Findley, D. A. Lytle, O. G. Gutiérrez-Raucha, J. A. Alvarado-Castro y A. Varela-Romero. 2014. Biogeography and conservation of aquatic fauna in spring-fed tropical canyons of the southern Sonoran Desert, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 23: 2705-2748.
- Bohonak, A. J. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly review of Biology* 74: 21-45.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F. L., B. Chernoff, R. L. Elder, J. M. Humphries, G. R. Smith Jr. y R. E. Strauss. 1985. *Morphometrics in evolutionary biology*. Academy of Natural Sciences, Philadelphia. 15-277
- Bouza, C., R. Vilas y J. Castro. 2008. Mitochondrial haplotype variability of brown trout populations from north-western Iberian peninsula, a secondary contact area between lineages. *Conservation Genetics* 9: 917–920.
- Brandenburg, W. D., J. L. Kennedy y M. A. Farrington. 2015. Determining the historical distribution of the Gila robusta complex (Gila Chub, Gila intermedia, Headwater Chub, *Gila nigra*, and Roundtail Chub, *Gila robusta*) in the Gila River Basin, New Mexico, using morphological analysis. Final Report to the New Mexico Game and Fish Department.
- Branson, B. A., C. J. McCoy y M. E. Sisk. 1960. Notes on the freshwater fishes of Sonora with an addition to the known fauna. *Copeia* 3:217–220.
- Búrquez, A., A. Martínez-Yrizar, R. S. Felger y D. Yetman. 1999. Vegetation and habitat diversity at the southern edge of the Sonoran Desert. 36-67 p. En: Robichaux, R. H. (Ed.), *Ecology of Sonoran Desert Plants and Plant communities*. University of Arizona Press, Tucson.
- Caldecutt, W. C. y D. C. Adams. 1998. Morphometrics of trophic osteology in the Threespine Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Copeia* 1998: 827-838.
- Calmus, T. 2011. Evolución geológica de Sonora durante el Cretácico Tardío y el Cenozoico. 227-266 p. En: Calmus, T. (Ed.), *Panorama de la geología de Sonora, México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología.
- Carter, J. M., C. D. Crowder, D. J. Leavitt, A. S. Makinster y B. Hickerson. 2016. Classification success of species within the Gila robusta complex using morphological and meristics characters – a reexamination. Report to the Arizona Game and Fish Department.
- Carvalho, D. C., D. A. Neto, B. S. Brasil y D. A. Oliveira. 2011. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA* 22: 97–105.
- Cavalcanti, M. J., L. R. Monteiro y P. R. D. Lopes. 1999. Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei). *Zoological Studies* 38: 287-294.
- Cavender, T y M. Coburn. 1992. Phylogenetic relationships of North American Cyprinidae. 293-327 p. En: Mayden, R. L. (Ed.), *Systematics, historical ecology, and North American freshwater fishes*. Stanford University Press, Stanford, California.

- Cicek, T., A. Kaya, S. Bilici y E. Ünlu. 2016. Size and shape analysis of two close Cyprinidae species (*Garra variabilis*-*Garra rufa*) by geometric morphometric methods. *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 2: 35-44.
- Coburn, M. M. y T. M. Cavender. 1992. Interrelationships of North American cyprinid fishes. 328–373 p. En: Mayden, R. L. (Ed.), *Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press, Stanford, California.
- Coney, P. J. 1979. Tertiary evolution of Cordilleran metamorphic core complexes. 15-28 p. En: Armentrout J. M., Cole M. R., Terbest Jr H. (Eds.), *Cenozoic paleogeography of western United States*. Special Publish Society Econ Paleontology Mineral Pacific Coast Paleogeography Symposium. University of Arizona, Tucson.
- Cockerell, T. D. A. 1909. The Nomenclature of the Inerican Fishes Usually Called *Leuciscus* and *Rutilus*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 22: 215-218.
- Connelly, H. M., C. R. Tabiti y L. G. Kral. 2006. Population Structure of the Tallapoosa Shiner (*Cyprinella gibbsi*) and the Tallapoosa Darter (*Etheostoma tallapoosae*). *Southeastern Naturalist* 5: 85–92.
- Cope, E. D. 1872. Report on the recent reptiles and fishes of the survey collected by Campbell, Carrington, and C.B. Dawes. Preliminary Report of the U.S. Geological Survey of Territories. U.S. Geological Survey, Washington, D.C.
- Copus, J. M., Z. Foresman, W. L. Montgomery, B. W. Bowen y R. J. Toonen. 2016. Revision of the *Gila robusta* (Teleostei, Cyprinidae) species complex: Morphological examination and molecular phylogenetics reveal a single species. Report to the Joint ASIH-AFS Committee on Names of Fishes.
- Corti, M. y D. Crosetti. 1996. Geographic variation in the grey mullet: a geometric morphometric analysis using partial warp scores. *Journal of Fish Biology* 48: 255-269.
- Corti, M., A. Loy y S. Cataudelia. 1996. Form changes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Moronidae: Teleostei), after acclimation to freshwater: an analysis using shape coordinates. *Environmental Biology of Fishes* 47: 165-175.
- Corti, M., R. S. Thorpe, L. Sola, V. Sbordoni y S. Cataudella. 1988: Multivariate morphometrics in aquaculture: a case study of six stocks of the common carp (*Cyprinus carpio*) from Italy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1548-1554.
- Coyne, J. A. y H. A. Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. 28-59 p. En: Otte, D., J. A. Endler (Eds.), *Speciation and its Consequences*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Crittenden, M. D. Jr. 1980. Cordilleran metamorphic core complexes of the North America Cordillera--Summary. *Geological Society of America Mem* 153: 485-490.
- DeMarais, B. D. 1991. *Gila eremica*, a new cyprinid fish from northwestern Sonora, México. *Copeia* 1: 179-189.
- Dawson, M.N. y W.M. Hamner. 2008. A biophysical perspective on dispersal and the geography of evolution in marine and terrestrial systems. *Journal of the Royal Society Interface* 5: 135–150.
- DeMarais, B. D. y W. L. Minckley. 1993. Genetics and morphology of Yaqui chub *Gila purpurea*, an endangered cyprinid fish subject to recovery efforts. *Biological Conservation* 66: 195-206.

- DeMarais, B. D., T. E. Dowling, M. E. Douglas, W. L. Minckley y P. C. Marsh. 1992. Origin of *Gila seminuda* (Teleostei: Cyprinidae) through introgressive hybridization: implications for evolution and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 89: 2747-2751.
- De Oliveira-Ribeiro, A., R. A. Caires, T. C. Mariguela, L. H. Pereira, R. Hanner y C. Oliveira. 2012. DNA barcodes identify marine fishes of Sao Paulo State, Brazil. *Molecular Ecology Resources* 12: 1012-1020.
- DeSalle, R., M. G. Egan y M. Siddall. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1905-1916.
- DeSalle, R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff. *Conservation Biology* 20: 1545-1547.
- Dominguez-Dominguez, O., A. Pompa-Domínguez e I. Doadrio. 2007. A new species of the genus *Yuriria* Jordan & Evermann, 1896 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Ameca basin of the central Mexican plateau. *Graellsia* 63: 259-271.
- Dominguez-Dominguez, O., R. Pérez-Rodríguez, L. H. Escalera-Vázquez e I. Doadrio. 2009. Two new species of the genus *Notropis* Rafinesque, 1817 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Lerma River Basin in Central Mexico. *Hidrobiología* 19: 159-172.
- Douglas, M. E., M. R. Douglas, J. M. Lynch y D. M. McElroy. 2001. Use of geometric morphometrics to differentiate *Gila* (Cyprinidae) within the Upper Colorado River Basin. *Copeia* 2001: 389-400.
- Dowling, T. E. y B. D. DeMarais. 1993. Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. *Nature* 362: 444-446.
- Dowling, T. E., C. A. Tibbets, W. L. Minckley y G. R. Smith. 2002. Evolutionary Relationships of the Plagopterins (Teleostei: Cyprinidae) from Cytochrome *b* Sequences. *Copeia* 2002: 665-678.
- Dowling, T. E., C. D. Anderson, P. C. Marsh y M. S. Rosenbert. 2015. Population structure in the Roundtail Chub (*Gila robusta* complex) of the Gila River basin as determined by microsatellites: Evolutionay and conservation implications. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0139832
- Drummond, A., S. Ho, M. Phillips y A. Rambaut. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4: e88.
- Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie y A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
- Dryden, I. L y K. V. Mardia. 1998. *Statistical shape analysis*. Wiley, Chichester.
- Eastman, C. R. 1917. Fossil fishes in the collection of the United States National Museum. *Proceedings of the United States of National Museum* 52: 235-304.
- Echelle, A. A., R. A. Van Den Bussche, T. P. Malloy, Jr., M. L. Haynie y C. O. Minckley. 2000. Mitochondrial DNA variation in pupfishes assigned to the species *Cyprinodon macularius* (Atherinomorpha: Cyprinodontidae): taxonomic implications and conservation genetics. *Copeia* 2000: 353-364.
- Eggert, L. S., C. A. Rasner y D. S. Woodruff. 2002. The evolution and phylogeography of the African elephant inferred from mitochondrial DNA sequence and nuclear microsatellite markers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 269: 1993-2006

- Elliott, N. G., K. Haskard y J. A. Koslow. 1995. Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of southern Australia. *Journal of Fish Biology* 46: 202-220.
- Erickson, D. L. y W. J. Kress. 2012. Future directions. En: Kress J. W. y Erickson D. L. (Eds.), *DNA barcodes: methods and protocols. Methods in Molecular Biology* 858: 459-465.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An Integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47-50.
- Felger, R. S. 1999. The flora of Cañón Nacapule: a desert-bounded tropical canyon near Guaymas, Sonora, Mexico. *Proceedings of the San Diego Society of Natural History* 35: 1-42.
- Fisher, R. A. 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of eugenics* 7: 179-188.
- Floyd, R., E. Abebe, A. Papert y M. Blaxter. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 11: 839-850.
- Ferrari, L., M. Lopez-Martínez, G. Aguirre-Díaz y G. Carrasco-Nuñez. 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: from the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27: 303-306.
- Ferrari, L., M. Valencia-Moreno y S. Bryan. 2005. Magmatismo y tectónica en la Sierra Madre Occidental y su relación con la evolución de la margen occidental de Norteamérica. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. Volumen conmemorativo del centenario. Temas selectos de la Geología Mexicana* 7: 343-378.
- Fišer Pečnikar, Ž. y E. V. Buzan. 2014. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *Journal of applied genetics* 55: 43-52.
- Fontana, F., F. Conterio, G. Gandolfi, J. Tagliavini, H. Rosenthal, P. Bronzi y D. J. McKenzie. 2007. Mitochondrial DNA sequences of 6 Sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae. *Journal of Applied Ichthyology* 15: 17-22.
- Galloway, W. E., T. L. Whiteaker y P. Ganey-Curry. 2011. History of Cenozoic North American drainage basin evolution, sediment yield, and accumulation in the Gulf of Mexico basin. *Geosphere* 7: 938-973.
- Garman, S. 1881. "New and little-known reptiles and fishes in the museum collections". *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 8: 85-93.
- George, A. L., J. B. Caldieraro, K. M. Chartrand y R. L. Mayden. 2008. Population Genetics of the Blue Shiner, *Cyprinella caerulea*. *Southeastern Naturalist* 7(4): 637-650.
- Gerber, A. S., C. A. Tibbets y T. E. Dowling. 2001. The role of introgressive hybridization in the evolution of the *Gila robusta* complex (Teleostei: Cyprinidae). *Evolution* 55: 2028-2039.
- Ghojoghi, F., A. Kamali, S. Eagderi, M. Soltani e I. Hashemzadeh. 2014. Morphological variation among the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) populations from the Southern Caspian Sea using Geometric Morphometrics technique. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 3: 105-111.

- Gilbert, C. R. 1998. Type catalog of recent and fossil North American freshwater fishes: families Cyprinidae, Catostomidae, Ictaluridae, Centrarchidae, and Elasmobranchidae. Florida Museum of Natural History, Special Publication 1: 1-284.
- Girard, C. 1856. Researches upon the cyprinoid fishes inhabiting the freshwaters of the United States of America west of the Mississippi Valley, from specimens in the museum of the Smithsonian Institution. Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia 8: 165-213.
- Gompert, Z., C. C. Nice, J. A. Fordyce, M. L. Forister y A. M. Shapiro. 2006. Identifying units for conservation using molecular systematics: the cautionary tale of the Karner blue butterfly. *Molecular Ecology* 15: 1759–1768.
- Gould, S. J. 2002. The structure of evolutionary theory. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Grismer L. L. y J. A. McGuire. 1993. The oases of central Baja California, México. Part I. A preliminary account of the relict mesophilic herpetofauna and the status of the oases. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 92: 2-24.
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., C. Cantalapiedra-Navarrete, M. Montes-Borrego, J. E. Palomares-Rius y P. Castillo. 2013. Molecular phylogeny of the nematode genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) with description of three new species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 167: 473-500.
- Haddon, M. y T. J. Willis. 1995. Morphometric and meristic comparison of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*, Trachichthyidae) from the Puysegur Bank and Lord Howe Rise, New-Zealand, and its implications for stock structure. *Journal of Marine Biology* 123: 19-27.
- Hajibabaei, M. 2012. The golden age of DNA metasystematics. *Trends in Genetics* 28: 535–537.
- Hajibabaei, M., D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs y P. D. Hebert. 2006a. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 968-971.
- Hajibabaei, M., G. A. Singer y D. A. Hickey. 2006b. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome* 49: 851-854.
- Hardman, M. y L. M. Page. 2003. Phylogenetic Relationships among Bullhead Catfish on the Genus *Ameiurus* (Siluriformes: Ictaluridae). *Copeia* 1: 20-33.
- Hartl, D. L. 1981. *A Primer of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, y J. R. Dewaard. 2003a. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-322.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham y J. R. DeWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 270: S96–S99.
- Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemplak, y C. M. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology* 2: 1657-1663.
- Hedrick, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59: 1633–1638.

- Heinrichs, J., H. P. Kreier, K. Feldberg, A. R. Schmidt, R. L. Zhu, B. Shaw, y V. Wissemann. 2011. Formalizing morphologically cryptic biological entities: new insights from DNA taxonomy, hybridization, and biogeography in the leafy liverwort *Porella platyphylla* (Jungermanniopsida, Porellales). *American Journal of Botany* 98: 1252-1262.
- Hendrickson, D. A., W. L. Miller, D. J. Siebert y P. H. Minckley. 1981. Fishes of the Río Yaqui, basin México and United States. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 15: 65-106.
- Hernandez-Davila, A., J. A. Vargas, N. Martinez-Mendez, B. K. Lim, M. D. Engstrom y J. Ortega. 2012. DNA barcoding and genetic diversity of phyllostomid bats from the Yucatan Peninsula with comparisons to Central America. *Molecular Ecology Resources* 12: 590-597.
- Hossain, M. A. R., M. Nahiduzzaman, D. Saha, M. U. H. Khanam y M. S. Alam. 2010. Landmark-based morphometric and meristic variations of the endangered carp, *Kalibaas labeo calbasu*, from stocks of two isolated rivers, the Jamuna and Halda, and a hatchery. *Zoological Studies* 49: 556-563.
- Hotelling, H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 24: 417-441.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N. E. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April y L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS one* 3(6): e2490.
- Hubbs, C. L. 1940. Speciation of fishes. *The American Naturalist* 74: 198-211.
- Hubbs, C. L. y K. F. Lagler. 1958. Fishes of the Great Lakes region. Ann Arbor. University of Michigan Press. Michigan.
- Huxley, J. 1938. Clines: an auxiliary method in taxonomy. *Bijdragen tot de Dierkunde (Leiden)* 27: 491-520.
- IUCN 2063. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016.1. <www.iucnredlist.org>.
- Ivanova, N. V., T. S. Zemlak, R. H. Hanner y P. N. D. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544-548.
- Johnson, J. B. y S. Jordan. 2000. Phylogenetic divergence in leatherside chub (*Snyderichthys copei*) inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Molecular Ecology* 9: 1029-1035.
- Jolicoeur, P. 1963. The multivariate generalization of the allometry equation. *Biometrics* 19: 497-499.
- Jordan, D. S. y C. H. Gilbert. 1877. On the genera of North American fresh-water fishes. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 29: 83-104.
- Jörger, K. M. y M. Schrödl. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology* 10: 59.
- Jörger, K. M. y M. Schrödl. 2014. How to use CAOS software for taxonomy? A quick guide to extract diagnostic nucleotides or amino acids for species descriptions. *Spixiana* 37: 21-26.
- Juárez-Romero, L., A. Varela-Romero y J. R. Campoy-Favela. 1988. Observaciones preliminares sobre la ictiofauna del Río Mátape, Sonora, México. *Mem. Congreso Nacional de Zoología*. Villahermosa, Tabasco, 9: 27-33.
- Kelly, R. P., I. N. Sarkar, D. J. Eernisse y R. Desalle. 2007. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology Notes* 7: 177-183.

- Khataminejad, S., H. Mousavi-Sabet, M. Sattari, S. Vatandoust y S. Eagderi. 2013. A comparative study on body shape of the genus *Alburnus* (Rafinesque, 1820) in Iran, using geometric morphometric analysis. *Caspian Journal of Environmental Science* 11 : 205-215.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- King, R. E. 1939. Geological reconnaissance in northern Sierra Madre Occidental of Mexico. *Geological Society of American Bulletin* 50: 1625-1727.
- Klingenberg, C. P. 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics* 11: 623-635.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca y A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals-amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:6196-6200.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt y D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 8369-8374.
- Lara, A., R. Rodríguez, D. Casane, G. Côté, L. Bernatchez y E. García- Machado. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources* 10: 421-430.
- Li, G. Y., X. Z. Wang, Y. H. Zhao, J. Zhang, C. G. Zhang y S. P. He. 2009. Speciation and phylogeography of *Opsariichthys bidens* (Pisces: Cypriniformes: Cyprinidae) in China: analysis of the cytochrome *b* gene of mtDNA from diverse populations. *Zoological Studies* 48: 569-583.
- Lin, H. D, K. C. Hsu, K. T. Shao, Y. C. Chang, J. P. Wang, C. J. Lin y T. Y. Chiang. 2008. Population structure and phylogeography of *Aphyocypris kikuchii* (Oshima) based on mitochondrial DNA variation. *Journal of Fish Biology* 72: 2011-2025.
- Lowenstein, J. H., G. Amato y S. O. Kolokotronis. 2009. The real maccoyii: identifying tuna sushi with DNA barcodes—contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS ONE* 4, e7866.
- Luhariya, R. K., K. K. Lal, R. K. Singh, V. Mohindra, P. Punia, U. K. Chauhan, A. Gupta y W. S. Lakra. 2012. Genetic divergence in wild population of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) from nine Indian rivers analyzed through mtDNA Cytochrome *b* region. *Molecular Biology Reports* 39: 3659-3665.
- Lydeard, C. y K. J. Roe. 1997. The phylogenetic utility of the mitochondrial Cytochrome *b* gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. En: Kocher, T. D. y Stepien, C. A. (Eds.) *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press. San Diego. California. USA.
- Lyons, J, y N. Mercado-Silva. 2004. *Notropis calabazas* (Teleostei; Cyprinidae): New Species from the Río Pánuco Basin of Central México. *Copeia* 4: 868-87.
- Mabragana, E., J. M. Diaz de Astarloa, R. Hanner, J. Zhang y M. Gonzalez-Castro. 2011. DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS One* 6: e28655.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>.

- Mahalanobis, P. C. 1936. On the generalised distance in statistics, Proceedings of the National Institute of Science of India 12: 49-55.
- Mayden, R. L. 1989. Phylogenetic studies of North American minnows, with emphasis on the genus *Cyprinella* (Teleostei: Cypriniformes). Miscellaneous Publication Museum of Natural History, University of Kansas 80: 1-189.
- Mayden, R. L. 1999. Consilience and a hierarchy of species concepts: advances towards closure on the species puzzle. Journal of Nematology 31: 95-116.
- Mayden, R. L. 2002. On biological species, species concepts, and individuation in the natural world. Fish and Fisheries 2: 1-26.
- Mayden, R. L. 2013. Species, trees, characters, and concepts: ongoing issues, diverse ideologies, and a time for reflection and change. 171–191 p. En: Pavlinov, I. (Ed.), The Species Problem – Ongoing Issues. Tech Open Science, Rijeka, Croatia.
- Mayden, R. L., R. H. Matson y D. M. Hillis. 1992. Speciation in the North American genus *Dionda* (Teleostei: Cypriniformes). 710-746 p. En: Mayden, R. L. (Ed.), Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes. Stanford University Press. Stanford, California.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press. New York.
- Mayr, E. 1954. Changes of genetic environment and evolution. 157–180 p. En: Huxley, J., Hardy, A. C. y Ford, E. B. (Eds.), Evolution as a process. Allen & Unwin, London.
- McAndrew, B. J. y K. C. Majumdar. 1983. Tilapia stock identification using electrophoretic markers. Aquaculture 30: 249–261.
- McPhee, J. 1981. Basin and Range. Farrar, Straus and Giroux, New York.
- Meek, S. E. 1902. "A contribution to the ichthyology of Mexico". Field Columbian Museum Publication 63-128.
- Merz, J. E., T. M Garrison, P. S. Bergman, S. Blankenship y J. C. Garza. 2014. Morphological Discrimination of Genetically Distinct Chinook Salmon Populations: an Example from California's Central Valley. North American Journal of Fisheries Management 34: 1259-1269.
- Meyer, C. P. y G. Paulay. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. Plos Biology 3: 2229-2238.
- Miller, R. R. 1945. A new cyprinid fish from Southern Arizona, and Sonora, Mexico, with the description of a new subgenus of *Gila* and a review of related species. Copeia 1945: 104–110.
- Miller, R. R. 1959. Origin and affinities of the fresh-water fish fauna of western North America. 187–222 p. En: Hubbs, C. L. (Ed.), Zoogeography, vol. 51. Publ. American Association for the Advancement of Science.
- Miller, R. R. 1976. An evaluation of Seth E. Meeks contributions to Mexican ichthyology. Fieldiana Zoology 69: 1-31.
- Miller R. R. y Smith, M. L. 1986. Origin and geography of the fishes of Central Mexico. p 487-519. En: Hocutt C. H., Wiley E.O. (Eds.), The Zoogeography of North American Freshwater Fishes. Wiley-Interscience, New York.
- Miller, R. R. y C. Hubbs. 1962. *Gila pandora*, a cyprinid new to the Texas fish fauna. Texas Journal of Science 14: 111-113.
- Miller, R. R., W. L. Minckley y S. Norris. 2006. Freshwater fishes of Mexico. University of Chicago Press. Chicago. Illinois.
- Minckley, W. L., 1973. Fishes of Arizona. Arizona Game Fish Department, Phoenix.

- Minckley, W. L. y B. D. DeMarais. 2000. Taxonomy of chubs (Teleostei, Cyprinidae, genus *Gila*) in the American Southwest with comments on conservation. *Copeia* 2000: 251-256.
- Minckley, W. L., D. A. Hendrickson y C. E. Bond. 1986. Geography of western North American freshwater fishes: Description and relations to intracontinental tectonism. 519-614 p. En: Hocutt, C. H. y Wiley, E. O. (Eds.), *Zoogeography of freshwater fishes of North America*. Wiley Interscience, New York.
- Minckley, W. L. y P. C. Marsh. 2009. *Inland Fishes of the Greater Southwest: Chronicle of a Vanishing Biota*. University of Arizona Press, Tucson.
- Mojekwu, T. O. y C. I. Anumudu. 2015. Advanced techniques for morphometric analysis in fish. *Journal of Aquaculture Research & Development* 6: 354.
- Mora-Álvarez, G. y F. W. McDowell. 2000. Miocene volcanism during late subduction and early rifting in the Sierra Santa Ursula of western Sonora, Mexico. En: Stock, J. M., Delgado-Granados H. y G. Aguirre-Díaz. (Eds.), *Cenozoic tectonics and volcanism of Mexico*. Geological Society of America Special Papers 334: 123-141.
- Moritz, C. 1994a. Defining “evolutionarily significant units” for conservation. *Trends Ecol Evol* 9: 373-375.
- Moritz, C. 1994b. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: A critical review. *Mol Ecol* 3:401-411.
- Murray, B. W., J. Y. Wang, S. C. Yang, J. D. Stevens, A. Fisk y J. Svavarsson. 2008. Mitochondrial cytochrome *b* variation in sleeper sharks (Squaliformes: Somniosidae). *Marine Biology* 153: 1015-1022.
- Nanney, D. L. 1982. Genes and phenes in tetrahymena. *BioScience* 32: 783-788.
- Nekola, J. C. y M. Barthel. 2002. Morphometric analysis of the genus *Carychium* in the Great Lakes region. *Journal of Conchology* 37: 515–531.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*. John Wiley and Sons, New York. 600
- Nelson, J. S., E. J. Crossman, H. Espinosa-Pérez, L. T. Findley, C. R. Gilbert, R. N. Lea y J. D. Williams. 2004. *Common and Scientific names of fishes from the United States, Canada and México*. 6a Ed. American Fisheries Society, Special Publication 29. Bethesda, Maryland.
- Nielsen, J y D. Powers. 1995. Evolution and the aquatic ecosystem defining unique units in population conservation American Fisheries Society Symposium 17 Bethesda, Maryland.
- Norris, S. M., J. M. Fischer y W. L. Minckley. 2003. *Gila brevicauda* (Teleostei: Cyprinidae), a new species of fish from the Sierra Madre Occidental of México. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 14: 19-30.
- SEMARNAT. 2010. NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental 1160 – 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. Segunda Sección, Diciembre.
- Oleinik, A. G., L. A. Skurikhina y V. A. Brykov. 2007. Divergence of *Salvelinus* sp from north eastern Asia based on mitochondrial DNA. *Ecology of Freshwater* 16: 87-98.
- Osborne, M., A Sharp, J. Monzingo, D.L. Propst y T.F. Turner. 2012. Genetic analysis suggests high conservation value of peripheral populations of Chihuahua chub (*Gila nigrescens*). *Conservation Genetics* 13: 1317-1328.

- Packer, L., J. Gibbs, C. Sheffield y R. Hanner. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources* 9: 42-50.
- Page, L. M., H. Espinosa-Perez, L. T. Findley, C. R. Gilbert, R. N. Lea, N. E. Mandrak, R. L. Mayden y J. S. Nelson. 2013. *Common and Scientific Names of Fishes from the United States, Canada, and Mexico*, 7th edition. American Fisheries Society Special Publication 34, Bethesda, Maryland.
- Page, L. M., C. C. Baldwin, H. Espinosa-Perez, C. R. Gilbert, K. E. Hartel, R. N. Lea, N. E. Mandrak, J. J. Schmitter-Soto y H. J. Walker. 2016. Final report of the AFS/ASIH Joint Committee on the Names of Fishes on the taxonomy of Gila in the Lower Colorado River basin of Arizona and New Mexico. Report to the Arizona Game and Fish Department.
- Pakkasmaa, S. y J. Piironen. 2001. Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 231-239.
- Pearson, K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* 6: 559-572.
- Perdices, A., C. Cunha y M. M. Coelho. 2004. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 192-203.
- Pereira, L. H., M. F. Pazian, R. Hanner, F. Foresti y C. Oliveira. 2011. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Parana Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA* 22: 87-96.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1: 817-818.
- Posada, D. y T. R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet y G. Achaz. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864-1877.
- Rach, J., R. DeSalle, I. N. Sarkar, B. Schierwater y H. Hadrys. 2008. Characterbased DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 275: 237-247.
- Raisz, E. 1964. *Landforms of Mexico*. Geography Branch of the Office of Naval Research, 2nd Edition. Cambridge.
- Rambaut, A. 2014. FigTree v1.4.2: Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk>.
- Rambaut, A. y A. J. Drummond. 2015. TreeAnnotator v1.8.2: MCMC Output analysis, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Rambaut, A., M. A. Suchard, D. Xie y A. J. Drummond. 2014. Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rinne, J. N. 1976. Cyprinid fishes of the genus *Gila* from the lower Colorado River basin. *Wasmann Journal of Biology* 34: 65-107.
- Rohlf, F. J. y D. E. Slice. 1990. Extensions of the Pro-crustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40-59.
- Rohlf, F. J. y F. Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends In Ecology and Evolution* 8: 129-132.

- Rohlf, F. J. 1999. On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix* 11: 1-17.
- Roldán-Quintana, J., G. Mora-Klepeis, T. Calmus, M. Valencia-Moreno y R. Lozano-Santacruz. 2004. El graben de Empalme, Sonora, México: magmatismo y tectónica extensional asociadas a la ruptura inicial del Golfo de California. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 21: 320-334.
- Rosenfeld, M. J. y J. A. Wilkinson. 1989. Biochemical genetics of the Colorado River Gila complex (Pisces; Cyprinidae). *Southwestern Naturalist* 34: 232-244.
- Rüber, L. y D. C. Adams. 2001. Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from Lake Tanganyika. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 325-332.
- Sarkar, I. N., P. J. Planet y R. DeSalle. 2008. CAOS software for use in character-based DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 8: 1256-1259.
- Scarborough, R. y R. C. Brusca. 2015. Geologic origin of the Sonoran Desert. 71-84 p. En: Dimmitt, M. A., Comus, P. W. y Brewer, L. M. (Eds.), *A Natural History of the Sonoran Desert*, 2nd Edition. University of California Press, Berkeley, and Arizona-Sonora Desert Museum Press, Tucson.
- Schierenbeck, K. A. 2014. *Phylogeography of California: An Introduction*. University of California Press, Oakland, California.
- Schönhuth, S., A. Perdices, L. Lozano-Villano, F. García-de-León, H. Espinoza y R. L. Mayden. 2014. Phylogenetic relationships of North American western chubs of the genus *Gila* (Cyprinidae, Teleostei), with emphasis on southern species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 210-230.
- Schönhuth, S., D. K. Shiozawa, T. E. Dowling y R. L. Mayden. 2012. Molecular systematics of western North American cyprinids (Cypriniformes: Cyprinidae). *Zootaxa* 3586: 281-303.
- Schönhuth, S., I. Doadrio y R. L. Mayden. 2006. A biogeographic perspective on the phylogeny of Mexican cyprinids (Actinopterygii, Cyprinidae). 102-124 p. En: Lozano-Vilano, M. L. y Contreras-Balderas, A. J. (Eds.), *Studies of North American Desert Fishes in Honor of EP (Phil) Pister, Conservationist*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo Leon.
- Schönhuth, S., L. Lozano-Vilano, A. Perdices, H. Espinosa y R. L. Mayden. 2015. Phylogeny, genetic diversity and phylogeography of the genus *Codoma* (Teleostei, Cyprinidae). *Zoological Scripta* 44: 11-28.
- Schönhuth, S., M. J. Blum, L. Lozano-Vilano, D. A. Neely, A. Varela-Romero, H. Espinosa, A. Perdices y R. L. Mayden. 2011. Interbasin exchange and repeated headwater capture across the Sierra Madre Occidental inferred from the phylogeography of Mexican stonerollers. *Journal of Biogeography* 38: 1406-1421.
- Simons, A. M. y R. L. Mayden. 1997. Phylogenetic relationships of the Creek Chubs and the Spine-Fins: an enigmatic group of North American cyprinid fishes (Actinopterygii: Cyprinidae). *Cladistics* 13: 187-205.
- Simons, A. M. y R. L. Mayden. 1998. Phylogenetic relationships of the western North American phoxinins (Actinopterygii: Cyprinidae) as inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 308-329.

- Simons, A. M., P. B. Berendzen y R. L. Mayden. 2003. Molecular systematics of North American phoxinin genera (Actinopterygii: Cyprinidae) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* 139: 63–80.
- Smith, G. R., N. Morgan y E. Gustafson. 2000. Fishes of the Mio-Pliocene Ringold Formation, Washington: Pliocene capture of the Snake River by the Columbia River. *University of Michigan. Museum of Paleontology* 32: 1-47.
- Smith, G. R., R. R. Miller y W. D. Sable. 1979. Species relationships among fishes of the genus *Gila* in the Upper Colorado River drainage. *National Park Service: Publication Series* 5: 613-623.
- Smith, G. R., T. E. Dowling, K. W. Gobalet, T. Lugaski, D. K. Shiozawa y R. P. Evans. 2002. Biogeography and timing of evolutionary events among Great Basin fishes. 175-234 p. En: Hershler, R., Mansen, D. B. y Currey, D. R. (Eds.), *Great Basin Aquatic Systems History. Smithsonian Contributions to the Earth Sciences*, Washington, DC.
- Smith, M. L. y R. R. Miller. 1986. The evolution of the Rio Grande basin as inferred from its fish fauna. 457–485 p. En: Hocutt, C. H. y Wiley, E. O. (Eds.), *The Zoogeography of North American Freshwaters Fishes*. John Wiley and Sons Inc. USA.
- StatSoft, Inc. 1995. STATISTICA for Windows. [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.
- Stock, J. M. y K. V. Hodges. 1989. Pre-Pliocene extension around the Gulf of California, and the transfer of Baja California to the Pacific plate: *Tectonics* 8: 99-116.
- Strauss, R. E. y F. L. Bookstein. 1982. The truss: body form reconstructions in morphometrics. *Systematic Zoology* 31: 113-135.
- Swain, D. P y C. J. Foote. 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research* 43: 113-128.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Taylor, H. R. y W. E. Harris. 2012. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12: 377-388.
- Turan, C. 1999. A note on the examination of morphometric differentiation among fish Populations: The Truss System. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 23: 259-263.
- Turan, C., D. Erguden, M. Gurlek, N. Basusta y F. Turan. 2004. Morphometric structuring of Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Black, Aegean and Northeastern Mediterranean Seas. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 28: 865-871.
- Turner, R. M. y D. E. Brown. 1982. Tropical-subtropical desertlands. 180-221 p, 288-341 p. En: Brown, D. E. (Ed.), *Biotic communities of American Southwest*. Desert Plants 4. University of Arizona, Tucson, Arizona.
- U.S. Fish and Wildlife Services. 2010. Listing Status. <http://www.fws.gov/species/>.
- Uyeno, T. 1960. Osteology and Phylogeny of the American Cyprinid Fishes Allied to the Genus *Gila*. Unpublished Ph.D. Dissertation. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan.

- Uyeno, T. y R. R. Miller. 1963. Summary of late Cenozoic freshwater fish records for North America. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 31: 1-34.
- Van Devender, T. R. 2000. The deep history of the Sonoran Desert. 61-69 p. En: Phillips, S. J. y Comus, P. W. (Eds.), *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona-Sonora Desert Museum Press, Tucson, and University of California Press, Berkeley.
- Van Houdt, J. K., J. Pinceel, M. C., Flamand, M. Briquet, E. Dupont, F. A. M. Volckaert y P. V. Baret. 2005. Migration barriers protect indigenous Brown trout (*Salmo trutta*) populations from introgression with stocked hatchery fish. *Conservation Genetics* 6: 175-191.
- Varela-Romero, A. 2001. Newly documented localities for desert chub, *Gila eremica*, in tropical canyons, Río Mátape Basin, Sonora, Mexico. *Proceedings of the Desert Fishes Council* 32: 33.
- Varela-Romero, A. y D. A. Hendrickson. 2010. Peces dulceacuícolas. 339-356 p. En: Molina-Fraener F. E. y Van Devender T. R. (Eds.), *Diversidad biológica de Sonora*. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Vega-Granillo, L. 1992. Estudio hidrogeológico de la cuenca del río Mátape, Sonora. *Universidad de Sonora, Boletín del Departamento de Geología Universidad de Sonora* 9: 75-84.
- Vogler, A. 2006. Will DNA barcoding advance efforts to conserve biodiversity more efficiently than traditional taxonomic methods? Reply. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4: 272-273.
- Ward, R. D. 2012. FISH-BOL, a case study for DNA barcodes. *Methods in Molecular Biology* 858: 423-439.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last y P. D. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science* 360: 1847-1857.
- Walker, J. A. 1996. Principal components of body shape variation within an endemic radiation of threespine stickleback. 321-334 p. En: Marcus, L. F., Corti, M., Loy A., Naylor, G. J. P. y Slice D. E. (Eds.), *Advances in morphometrics*. NATO ASI Series A, Life Sciences. Vol. 284. Plenum Press, New York.
- Walker, J. A. 1997. Ecological morphology of lacustrine Threespine Stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. (*Gasterosteidae*) body shape. *Zoological Journal of the Linnean Society* 61: 3-50.
- Watanabe, K., N. Kanagawa, R. Kakioka, T. Itai y S. Mori. 2009. Genetic diversity and conservation units in wild and captive populations of endangered freshwater fishes: a case of *Hemigrammocypris rasborella* in Shizuoka, Japan. *Ichthyology Resources* 56: 411-416.
- Waugh, J., 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 29: 188-197.
- Wiadnya, D. G. R., D. Widodo y S. Soemarno. 2015. Intra- species variations of *photopectoralisbindus* (Family: *Leiognathidae*) collected from two geographical areas in East Java, Indonesia. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 6:160-168.

- Wiemers, M. y K. Fiedler. 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4: 8 doi: 10.1186/1742-9994-4-8.
- Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Wiley-Interscience, New York.
- Wiley, E. O., y R. L. Mayden. 2000. The evolutionary species concept. 70–89 p. En: Wheeler Q. D., R. Meier (Eds.), *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Columbia University Press, New York.
- Witt, J. D., D. L. Threlkoff y P. D. N. Hebert. 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology* 15: 3073-3082.
- Wong, M. S. y P. B. Gans. 2008. Geologic, structural, and thermochronologic constraints on the tectonic evolution of the Sierra Mazatán core complex, Sonora, Mexico: New insights into metamorphic core complex formation. *Tectonics* 27: TC4013. doi:10.1029/2007TC002173
- Workman, P. L. y J. D. Niswander. 1970. Population studies on Southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22: 24-29.
- Zardoya, R. e I. Doadrio. 1998. Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 265: 1365-1372.
- Zhang, A. B., L. J. He, R. H. Crozier, C. Muster y C. D. Zhu. 2010. Estimating sample sizes for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(3): 1035-1039.