



UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

AFINIDAD FILOGENÉTICA DEL PUPO PANZA VERDE (*Agosia chrysogaster* Girard, 1856) EN SONORA A PARTIR DE LA VARIACIÓN DE SUS GENES MITOCONDRIALES Y NUCLEARES.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

MARISOL ANDREA PAREDES GALLARDO

Hermosillo, Sonora, México

enero de 2022

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

Hermosillo, Sonora a 7 de enero del 2022

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **AFINIDAD FILOGENÉTICA DEL PUPO PANZA VERDE (*Agosia chrysogaster* Girard, 1856) EN SONORA A PARTIR DE LA VARIACIÓN DE SUS GENES MITOCONDRIALES Y NUCLEARES**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestra en Biociencias** virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

ATENTAMENTE



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

MARISOL ANDREA PAREDES GALLARDO

Hermosillo, Sonora, México

Enero, 2022

**AFINIDAD FILOGENÉTICA DEL PUPO PANZA VERDE (*Agosia chrysogaster* Girard,
1856) EN SONORA A PARTIR DE LA VARIACIÓN DE SUS GENES
MITOCONDRIALES Y NUCLEARES**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

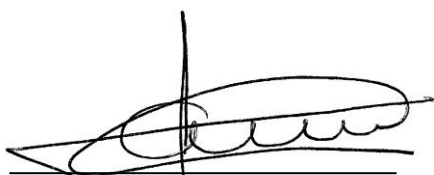
MARISOL ANDREA PAREDES GALLARDO

Hermosillo, Sonora, México

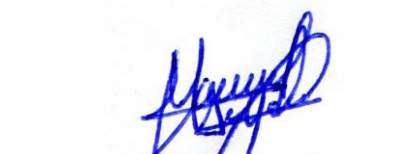
enero de 2022

APROBACIÓN

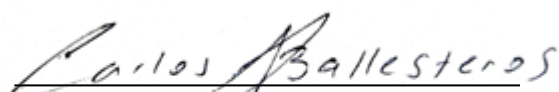
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Afinidad filogenética del pupo panza verde (*Agosia chrysogaster* Girard, 1856) en Sonora a partir de la variación de sus genes mitocondriales y nucleares” presentada por Marisol Andrea Paredes Gallardo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Alejandro Varela Romero
Director



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Sinodal Secretario



Dr. Carlos Alonso Ballesteros Córdova
Sinodal



Dr. Enrique De la Re Vega
Sinodal

DEDICATORIA

A mis padres, Gerardo y Marisol, por ser los dos principales pilares en mi vida, por darme su amor, paciencia y consejos, porque sin ellos no sería lo que soy ahora y nada de esto habría sido posible, esto es para ustedes.

A mis hermanos, Omar, Desiree y Danna, por siempre darme sus ánimos y admiración, y por regalarme momentos felices cuando más los necesito, ustedes son mi ejemplo a seguir, mil gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, gracias por hacer posible el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad de Sonora por ser parte de mi formación académica profesional y de posgrado, en ella encontré más que formación académica.

Al Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por permitirme superarme y realizar mis estudios en esta etapa.

Agradecemos al Arizona Game and Fish Department por el apoyo financiero al proyecto.

Al Centro de Estudios de Desiertos y Océanos (CEDO) por su apoyo en la captura y manejo de los ejemplares del refugio para muestras de los peces, en especial a Nélida Barajas y a Abelardo Castillo Rosas y Ángeles Y. Sánchez Cruz responsables de la UMA.

Al M. C. Francisco Abarca por su asistencia en la generación del proyecto.

A SEMARNAT por otorgar la licencia para la recolecta de los peces SGPA/DGVS/01686/21.

Al Consejo de los Peces del Desierto (Desert Fishes Council) por todo el apoyo otorgado a mi investigación y por darme la oportunidad de presentarme en sus congresos internacionales.

Especial agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Alejandro Varela Romero, por guiarme como nadie lo hubiera hecho en esta etapa, por todo su apoyo, consejos, enseñanzas y dedicación a mi proyecto de tesis, muchísimas gracias.

A los miembros de mi comité de tesis, al Dr. Carlos Alonso Ballesteros Córdova, al Dr. José Manuel Grijalva Chon y al Dr. Enrique De La Re Vega, por su paciencia e instrucción a lo largo de este proyecto, gracias por abrirme las puertas y guiarme desde el principio de esta etapa.

A mis compañeros que estuvieron conmigo desde el primer día apoyándome en el camino, al M.C. Alexandre Gutiérrez Barragán por toda su ayuda en el laboratorio, en las salidas de campo y en cada duda que pudiera presentármese, y al Biól. Germán Salazar Cabral por su

compañerismo durante estos dos años, muchísimas gracias a ambos por su amistad y enseñanzas.

A Omar Ávila García, por todo su apoyo incondicional, la motivación brindada cada día para superarme cada vez más, y todo su amor hasta este día.

A mis compañeras de generación de posgrado, Gabriela, Laura y Adriana por su amistad, sus consejos y entusiasmo mutuo para lograr culminar esta etapa, un millón de gracias.

RESUMEN

A. chrysogaster habita las cuencas de los ríos Colorado, Gila, Sonoyta y de la Concepción en Sonora y EUA. Debido a la pérdida histórica de sus poblaciones se ha catalogado Amenazada en México y en la IUCN. La población del Río Sonoyta se encuentra extirpada y persiste en un refugio artificial en el Centro de Estudios de Desiertos y Océanos (CEDO) en Puerto Peñasco. Este estudio evalúa la identidad específica y la afinidad filogenética de sus poblaciones utilizando ADN mitocondrial y nuclear. De 80 ejemplares recolectados en las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y Sonoyta (Refugio del CEDO) en Sonora, se amplificaron los genes *Cytb*, *COXI* y *ND2* mitocondriales y el gen nuclear *RAG1*. Las filogenias mitocondrial y nuclear muestran monofiléticas todas sus poblaciones sin generar clados geográficos. El *Cytb* y su concatenado con *COXI* sustentan un clado independiente del Río Sonoyta anidado al interior de todos los individuos analizados. El código de barras mostró 18 caracteres puros que discriminan todos los individuos analizados de su género hermano *Algansea* y es congruente con la señal filogenética. Un polimorfismo fijo por *COXI* en los cinco ejemplares del Río Sonoyta (refugio del CEDO) indica la divergencia de la población del Río Sonoyta. En cuanto a los análisis de variabilidad genética, se mostró un alto grado de variabilidad entre las poblaciones, mientras que los valores de *Fst* y *Nem* sugieren un alto grado de diferenciación genética, lo que indica poca presencia de flujo genético entre dichas poblaciones. Por otro lado, la cuenca del Río Sonoyta (refugio del CEDO) no comparte haplotipos con el resto de las cuencas. El Río Santa Cruz mostró los valores mayores en los índices de diversidad molecular, mientras que para el Río Sonoyta la diversidad fue cero. Esto se requiere comprobar con evidencia morfológica adicional, sin retrasar los esfuerzos urgentes de recuperación y conservación de esta población cautiva.

ABSTRACT

A. chrysogaster inhabits the Colorado, Gila, Sonoyta and Concepción rivers basins in Sonora and USA. Due the historical populations loss it has been listed as Threatened in Mexico and by the IUCN. The Sonoyta River population is extirpated and persists in an artificial refuge at the CEDO in Puerto Peñasco. This study evaluates the specific identity and phylogenetic affinity of their populations using mitochondrial and nuclear DNA. From 80 specimens collected in the Concepción, Santa Cruz and Sonoyta rivers basins (Refuge del CEDO) in Sonora, the *Cytb*, *COXI* and *RAG1* genes were amplified. The mitochondrial and nuclear phylogeny show monophyletic all their populations without generating geographic clades. The *Cytb* and it's concatenated with *COXI* support an independent clade of the Sonoyta River, nested within all the individuals analyzed. The barcode showed 18 pure characters that discriminate all the analyzed individuals of its sister genus *Algansea* and is congruent with the phylogenetic signal. A fixed polymorphism by *COXI* in the five specimens of the Sonoyta River (CEDO refuge) indicates the divergence of the Sonoyta River population. The genetic variability analyzes was shown a high degree of variability between the populations, while the *Fst* and *Nem* values suggest a high degree of genetic differentiation, which indicates little presence of gene flow between these populations. On the other hand, the Sonoyta River basin (CEDO refuge) does not share haplotypes with the rest of the basins. The Santa Cruz River basin showed the highest values in the molecular diversity indices, while for the Sonoyta River basin the diversity was zero. This needs to be verified with additional morphological evidence, without delaying urgent recovery and conservation efforts for this captive population.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES.....	3
I.1 Situación actual de <i>Agosia chrysogaster</i>	3
I.2 Sistemática y filogenia de <i>Agosia chrysogaster</i>	5
I.3 Código de barras del ADN	7
I.4 Variabilidad genética de la especie	9
II. HIPÓTESIS	10
III. OBJETIVOS	11
III.1. Objetivo general	11
III.2. Objetivos particulares.....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
IV.1. Recolecta de ejemplares	12
IV.2. Extracción de ADN y amplificación de genes mediante PCR.....	13
IV.3 Análisis filogenéticos para el linaje de <i>A. chrysogaster</i>	16
IV.4. Análisis de Código de barras del ADN de <i>A. chrysogaster</i>	20
IV.5. Análisis de variabilidad genética de las poblaciones del linaje de <i>A. chrysogaster</i>	20
V. RESULTADOS	22
V.1 Variación en las secuencias del gen mitocondrial <i>Cyt-b</i> para las poblaciones de <i>Agosia chrysogaster</i>	22
V.2. Relaciones filogenéticas para las poblaciones de <i>Agosia chrysogaster</i>	22
V.3. Análisis del código de barras del ADN de las poblaciones de <i>Agosia chrysogaster</i>	28
V.4. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de <i>Agosia chrysogaster</i>	30
VI. DISCUSIÓN	38
VI.1 Filogenia en las poblaciones de <i>Agosia chrysogaster</i>	38
VI.2 Caracteres diagnósticos para las poblaciones de <i>Agosia chrysogaster</i>	39
VI.3. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de <i>Agosia chrysogaster</i> ...	41
VII. CONCLUSIONES	43
VIII. RECOMENDACIONES.....	44
IX. LITERATURA CITADA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Localización geográfica de los sitios de recolecta para los ejemplares de *A. chrysogaster* analizados en el presente estudio. Los círculos con números en su interior indican las localidades de recolecta de la tabla 1, excepto para el Río Sonoyta. Las divisiones hidrográficas son representadas por líneas gruesas. Las líneas discontinuas indican cursos de agua intermitentes. A = Cuenca del Río Colorado, B = Cuenca del Río Sonoyta, C = Cuenca del Río Gila, D = Cuenca del Río de la Concepción, E = Cuenca del Río San Ignacio, G = Cuenca del Río Bacoachi, F = Cuenca del Río Sonora.14
- Figura 2.** Árbol filogenético con el gen *Cyt-b* resuelto por IB con el modelo evolutivo TrN+I+G para 35 integrantes de *A. chrysogaster* de las cuencas de los ríos bajo estudio y de miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012). Cuenca del Río de la Concepción: AC =Agua Caliente, M = Magdalena; SC = Cuenca del Río Santa Cruz; Cuenca del Río Sonoyta: Refugio del CEDO = C. ...25
- Figura 3.** Árbol filogenético con el concatenado de los genes *Cyt-b* y *COXI* resuelto por Inferencia Bayesiana con el modelo evolutivo TrN+I+G para 17 integrantes de *A. chrysogaster* de las cuencas de estudio, además de otros miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012). Cuenca del Río de la Concepción: AC =Agua Caliente, M = Magdalena; SC = Cuenca del Río Santa Cruz = SC; Cuenca del Río Sonoyta: Refugio del CEDO = C.26
- Figura 4.** Árbol filogenético con el gen RAG1 resuelto por Inferencia Bayesiana (modelo de evolución K80+G) para 21 integrantes de *A. chrysogaster* de las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y el refugio del CEDO, además de otros miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012). Cuenca del Río de la Concepción: AC =Agua Caliente, M = Magdalena; SC = Cuenca del Río Santa Cruz = SC; Cuenca del Río Sonoyta: Refugio del CEDO = C.27
- Figura 5.** Árbol de distancias genéticas por K2P para el gen *COXI* de los individuos de *Agosia chrysogaster* analizados.....29
- Figura 6.** Perfil de red haplotípica del gen *ND2* para las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*. El tamaño de los círculos es proporcional a los organismos que presentaron el haplotipo mostrado. Los puntos rojos representan el median vector que separa a los haplogrupos resueltos. Las marcas representan el número de pasos mutacionales. Azul = CEDO, Negro = Magdalena, Gris = Agua Caliente y Verde = Río Santa Cruz.....33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Localidades de recolecta para los ejemplares de <i>Agosia chrysogaster</i> en este estudio para análisis moleculares. USON = Universidad de Sonora, Hermosillo..13
Tabla 2.	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. <i>A. chrysogaster</i> = <i>Agosia chrysogaster</i> , <i>A. lacustris</i> = <i>Algansea lacustris</i> , <i>A. amecae</i> = <i>Algansea amecae</i> , <i>A. avia</i> = <i>Algansea avia</i> , <i>A. monticola</i> = <i>Algansea monticola</i> , <i>Y. alta</i> = <i>Yuriria alta</i> , <i>C. funduloides</i> = <i>Clinostomus funduloides</i> , <i>E. monachus</i> = <i>Erimonax monachus</i>17
Tabla 3.	Distribución de las frecuencias haplotípicas del gen <i>Cyt-b</i> para las poblaciones analizadas de <i>Agosia chrysogaster</i> en el Noroeste de México. H = haplotipos.22
Tabla 4.	Distribución de las frecuencias haplotípicas del gen <i>RAG1</i> para las poblaciones analizadas de <i>Agosia chrysogaster</i> en el Noroeste de México. H = haplotipos.24
Tabla 5.	Distribución de las frecuencias haplotípicas del gen <i>COI</i> para las poblaciones de <i>Agosia chrysogaster</i> en el Noroeste de México analizadas. H = haplotipos.28
Tabla 6.	Código de barras del ADN para <i>Agosia chrysogaster</i> (AC1, C1, M1, SC1), <i>Algansea amecae</i> , <i>Algansea lacustris</i> y <i>Algansea monticola</i> basado en atributos característicos puros (sPu) obtenido por CAOS.31
Tabla 7.	Distribución de las frecuencias haplotípicas para el gen <i>ND2</i> de las cuatro poblaciones del linaje de <i>A. chrysogaster</i> analizadas. H = haplotipos.32
Tabla 8.	Índices de diversidad molecular para las cuatro poblaciones del linaje de <i>A. chrysogaster</i> analizadas. Ts = transiciones Tv = transversiones, Sus = Sustituciones, Spr = Sitios privados, Spo = Sitios polimórficos.34
Tabla 9.	Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las cuatro poblaciones en conjunto del linaje de <i>A. chrysogaster</i>35
Tabla 10.	Índices pareados de diferenciación genética (<i>Fst</i>) para las cuatro poblaciones del linaje de <i>A. chrysogaster</i> . El asterisco (*) indica $P < 0.05$35
Tabla 11.	Número de migrantes pareados calculados por <i>Fst</i> para las siete poblaciones del linaje de <i>A. chrysogaster</i> . N/A = No se puede obtener el número de migrantes debido a un valor de <i>Fst</i> negativo.36
Tabla 12.	Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para las tres cuencas hidrológicas de las poblaciones analizadas del linaje de <i>A. chrysogaster</i>37

- Tabla 13.** Índices de diferenciación genética (F_{st}) pareados para las tres cuencas hidrológicas de las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*. El asterisco (*) indica $P < 0.05$37
- Tabla 14.** Número de migrantes por generación (N_m) pareados calculados por F_{st} las tres cuencas hidrológicas de las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*.37

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 más de dos mil especies y más de 200 géneros (Nelson, 1994). Al interior de la familia Cyprinidae, el género *Agosia* Girard, 1856 tiene como única especie a *Agosia chrysogaster* la cual se distribuye en regiones áridas y semiáridas del Oeste de Norteamérica (Schönhuth *et al.*, 2012, 2014).

El pupo panza verde *Agosia chrysogaster*, se encuentra en el Noroeste de México y el Suroeste de Estados Unidos, en las cuencas de los ríos Gila (Río Santa Cruz y Río San Pedro), Sonoyta y de la Concepción, estos últimos en Sonora (Miller *et al.*, 2009; Varela-Romero y Hendrickson, 2010). La población del Río Sonoyta se encuentra extirpada a causa a la extrema aridez y el uso indiscriminado del agua como recurso para el beneficio humano en la cuenca a ambos lados de la frontera. Debido a ello, las poblaciones remanentes fueron removidas del Río Sonoyta para crear estanques artificiales a manera de refugios para su resguardo en poblaciones al interior de la cuenca y posteriormente utilizarlas en la recuperación de la especie de la cuenca del Río Sonoyta. No obstante, solo la población de refugio del Centro de Estudios de Desiertos y Océanos (CEDO) ubicado en Puerto Peñasco es la única población sobreviviente. De tal manera que, evaluando su afinidad filogenética utilizando el gen mitocondrial *Cyt-b* y el gen nuclear *RAG1*, así como el código de barras de ADN a partir del gen *COXI* y la variabilidad genética por medio de *ND2*, hacen posible conocer su filogenia e historia evolutiva, así como la identidad específica de la especie (Hardman y Page, 2003; George *et al.*, 2008; April *et al.*, 2011).

Hasta hace algunos años, la identificación y clasificación de las especies era un trabajo exclusivamente taxonómico, sin embargo, la identificación de los organismos a partir de dichos caracteres morfológicos no es considerado algo preciso para la resolución a nivel de especie (Packer *et al.*, 2009). Actualmente, datos moleculares han señalado una gran cantidad de especies biológicas que aún sin poseer diferencias morfológicas presentan divergencia genética, 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). La técnica del código de barras del ADN ha sido aplicada como un método en taxonomía molecular para la identificación de especies y el descubrimiento de especies crípticas (Hebert *et al.*, 2003; Witt *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2010; Rach *et al.*, 2008). Los actuales enfoques disponibles para asignar códigos de barras a los diferentes taxones 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 utiliza 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). No obstante, los enfoques moleculares en la identificación de especies también pueden poseer ciertas limitaciones (Kress *et al.*, 2005) ya que no puede remplazar completamente los análisis taxonómicos exhaustivos y la filogenia molecular. Aun así, 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 analizado (Sarkar *et al.*, 2008; Erickson y Kress, 2012). Los estudios de genética poblacional a partir de diferentes marcadores moleculares, como nucleares y mitocondriales, han demostrado ser útiles para determinar la estructura genética de las poblaciones de peces, lo que ha propuesto el manejo independiente de cada una de ellas y al mismo tiempo complementario para una investigación más robusta (Echelle *et al.*, 2000; Connelly *et al.*, 2006).

En este trabajo se pretende determinar la afinidad filogenética y la identidad específica de las poblaciones de *A. chrysogaster* en Sonora a partir de la variación de sus genes mitocondriales *Cyt-b*, *COXI* y *ND2* y su gen nuclear *RAG1*. Además de conocer la variabilidad genética al interior de cada una de las subcuencas donde se distribuye.

I. ANTECEDENTES

I.1 Situación actual de *Agosia chrysogaster*

La familia Cyprinidae se conoce como la familia de las carpas, son peces dulceacuícolas distribuidos en ríos de África, Eurasia, Norteamérica y el norte de México (Nelson, 1994). El pupo panza verde *Agosia chrysogaster* forma parte de los peces dulceacuícolas de la familia Cyprinidae, una de las más diversas de Norteamérica (Schönhuth *et al.*, 2006). Esta especie habita en la cuenca del Río Colorado y Río Gila (ríos Santa Cruz [RSC] y San Pedro [RSP]) en el suroeste de Estados Unidos (EUA) y en el norte de Sonora en los ríos Sonoyta (RS) y de la Concepción (DLC) (Miller *et al.*, 2009; Varela-Romero y Hendrickson, 2010; Trujillo *et al.*, 2012; Troia *et al.*, 2015). El Río Sonoyta antiguamente desembocaba en el delta del Río Colorado previo a su desviación hacia el sur provocada por la formación de la Sierra del Pinacate, desembocando ahora en la Bahía de Adair (Lynch, 1981).

Esta especie ocupa una variedad de ambientes térmicos, desde afluentes de montañas frías hasta ríos cálidos de desierto (Troia *et al.*, 2015). Es un omnívoro facultativo que se alimenta de detritus y de una amplia variedad de plantas e invertebrados acuáticos y generalmente los individuos de esta especie tienen un periodo de vida no mayor a tres años (Miller *et al.*, 2009; Minckley y Marsh, 2009). Se le considera una especie generalista y un desovador oportunista ya que es capaz de responder a diversos cambios ambientales y su periodo de reproducción es de la primavera al verano (Minckley y Marsh, 2009; Trujillo *et al.*, 2012).

Dado que *A. chrysogaster* se considera muy uniforme en cuanto a su morfología, pero genéticamente diverso en todo su rango de distribución (Hendrickson, 1987, Tibbets, 1983; 1998; Tibbets y Dowling, 1996 Minckley y Marsh, 2009), los niveles de variación mitocondrial entre las poblaciones del alto Río Gila (Green river) y de las del resto de los ríos de la cuenca del Gila resultaron altos, lo que sugiere que existe un aislamiento a largo plazo de las regiones geográficas donde habita (Minckley y Marsh, 2009). Es por ello que anteriormente, su distribución se consideraba hasta las cuencas de los ríos Yaqui, Mayo, Fuerte y Sinaloa en Sonora, Chihuahua y Sinaloa. Sin embargo, el descubrimiento del pupo

mexicano como especie aún no descrita para el género *Agosia* y que ocupa esta distribución (Hendrickson, 1987; Miller *et al.*, 2009), ocasiona una reducción de más de la mitad de la antigua zona de ocupación de *A. chrysogaster*, incrementando la necesidad de la reevaluación de su estatus de conservación legal y promover la protección y recuperación de sus poblaciones.

De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), *A. chrysogaster* actualmente su estatus de conservación es Amenazada (Miller *et al.*, 2009; SEMARNAT, 2010). Esta consideración debe ser revisada debido a la drástica reducción del área de su distribución histórica con respecto a la actual y al reconocimiento de los impactos sobre sus poblaciones reportados en estudios recientes (Varela-Romero y Hendrickson, 2009; Minckley *et al.*, 2013). La población del Río Sonoyta se encuentra actualmente extirpada de su cauce natural y solo se cuenta con individuos en una población de refugio en Sonora, provenientes de los últimos individuos silvestres capturados en el Río Sonoyta. No obstante, a pesar de la pérdida de su distribución y abundancia, *A. chrysogaster* sigue siendo una de las especies localmente más abundantes en el suroeste de Estados Unidos y noroeste de México gracias a su notable capacidad de resistencia a ambientes extremos (Minckley y Marsh, 2009).

El aislamiento natural entre las poblaciones de *A. chrysogaster* en su distribución natural entre el Río Sonoyta y el resto de las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y San Pedro (Minckley y Marsh, 2009), además del aislamiento promovido por la pérdida y el deterioro de la calidad de los hábitats acuáticos en el suroeste de Norteamérica, incrementa la fragmentación y pérdida de sus poblaciones naturales. En el Río Sonoyta se registró la extirpación reciente de las poblaciones naturales del pupo panza verde debido a la pérdida del flujo de agua en el cauce del río (Minckley *et al.*, 2013). Por lo anterior, se desarrollaron actividades para el aseguramiento de la especie con la creación de refugios de poblaciones en cautiverio. Para el año 2011, se establecieron cinco refugios y se abastecieron del pez cachorrito del Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) y del pupo panza verde (*A. chrysogaster*). Estos refugios se ubicaron en Puerto Peñasco en el Centro de Estudios de Desiertos y Océanos AC (CEDO) y en el Centro de Estudios Tecnológicos del Mar (CETMAR), en Sonoyta en el

Colegio de Bachilleres (COBACH) y en la Reserva de la Biosfera El Pinacate y Gran Desierto de Altar (RBEPGDA, dos refugios). Sin embargo, no existieron eventos de reproducción para el pupo panza verde en los años siguientes, por lo que las poblaciones del COBACH y RBEPGDA desaparecieron paulatinamente (Minckley *et al.*, 2013). Recientemente en el 2018 se registró un evento de reproducción del pupo panza verde en el CEDO en Puerto Peñasco, notado debido a la remoción de los individuos de la población del pez cachorrito del Sonoyta contenidos en el mismo refugio. A partir de aquí, se creó un refugio independiente para el pupo panza verde donde actualmente se ha mantenido con eventos ocasionales de reproducción. Esta población se encuentra en etapa de recuperación en cuanto a su número poblacional, de tal manera que se hace necesario evaluar no solo su variabilidad genética, sino también su afinidad filogenética y su identidad específica con respecto al resto de las poblaciones naturales de la especie en toda su distribución, lo que permitirá conocer la situación actual de sus poblaciones para la construcción de un plan para su conservación.

I.2 Sistemática y filogenia de *Agosia chrysogaster*

A. chrysogaster contaba en el pasado con una distribución aparentemente homogénea debido a que, las cuencas de los ríos Sonoyta, de la Concepción, Santa Cruz y San Pedro, se les consideraba como una sola unidad hidrológica (Calmus *et al.*, 2011). Sin embargo, actualmente se encuentran separadas una de otra, colocando a la cuenca del Río de la Concepción como la más antigua de las cuatro cuencas, surgiendo hace aproximadamente 39 millones de años (Ma) en el Eoceno (Heindl *et al.*, 1963; Calmus *et al.*, 2011). Por otra parte, la cuenca del Río Sonoyta se formó aproximadamente entre 12 a 10 Ma en el Mioceno, mientras que las cuencas de los ríos Santa Cruz y San Pedro surgieron más recientemente hace 12 a 5 Ma aproximadamente, ya que la cuenca del Río Sonoyta y los ríos Santa Cruz y San Pedro formaban parte de la cuenca del Río Colorado (Menges, 1981; Huckleberry, 1996; Miller *et al.*, 2009). No obstante, la cuenca del Río Sonoyta fue aislada del resto de las cuencas hace aproximadamente 2.5 Ma a causa de la formación de la Sierra El Pinacate (Menges, 1981; Varela-Romero y Hendrickson, 2010). Debido a estos eventos, se cree que no existe intercambio genético entre las poblaciones de *A. chrysogaster* ya que su historia geológica revela aislamiento entre cuencas (Minckley y Marsh, 2009).

Los análisis morfométricos iniciales realizados en el género *Agosia* provienen de Hendrickson (1987). Sus resultados claramente indican que los especímenes del Río Sonoyta pertenecen al morfotipo norteño junto con los de las cuencas del Gila, Bill Williams y de la Concepción. Sin embargo, casi el 71% de los peces de los Ríos Sonoyta y Sonora mostraron tendencias hacia formas corporales intermedias entre los morfotipos norteño y sureño detectado para la especie. Además, el análisis genético basado en alozimas detectó un alelo único (peptidasa) en individuos del Río Sonoyta. Más recientemente, los estudios morfológicos sugieren que se encuentra más relacionado con el género *Rhinichthys* (Coburn y Cavender, 1992). Sin embargo, un estudio filogenético realizado por Schönhuth *et al.* (2006) que incluye a siete géneros de ciprínidos mexicanos (*Dionda*, *Notropis*, *Algansea*, *Cyprinella*, *Codoma*, *Compostoma* y *Agosia*) con base en secuencias del gen Citocromo b (*Cyt-b*), sugiere al género *Algansea*, como grupo hermano de *Agosia* (*A. chrysogaster*) del suroeste de Estados Unidos y Noroeste de México (Schönhuth *et al.*, 2006, Pérez-Rodríguez *et al.*, 2009). Esa información es sustentada por Schönhuth *et al.* (2012) donde se describe como grupo monofilético al género *Algansea* y es considerado grupo hermano de *Agosia*, ambos pertenecientes a un clado occidental que incluye a los géneros *Tampichthys*, *Codoma*, *Cyprinella*, *Yuriria*, *Hybognathus* y *Notropis*, todos cercanos filogenéticamente a *A. chrysogaster* (Schönhuth *et al.*, 2008). Además, también se han utilizado marcadores nucleares (*RAG1*, *S7* y *Rhod*) y mitocondriales (*Cyt-b*) en análisis filogenéticos entre ciprínidos de Norteamérica, entre ellos *A. chrysogaster* con resultados concordantes con respecto a su monofilia y relaciones evolutivas (Schönhuth *et al.*, 2012).

El marcador mitocondrial de gran uso en análisis filogenéticos en peces es el gen *Cyt-b*. La variación genética en este gen es el producto del modelo de replicación asimétrica del genoma mitocondrial, esto le confiere un nivel de variación genética moderado y describe las relaciones filogenéticas de casi la totalidad del grupo de peces óseos a nivel género y familia (Hardman y Page, 2003).

Las secuencias de nucleótidos de genes nucleares se han utilizado para reconstruir relaciones filogenéticas profundas dentro de varios grupos de vertebrados (Baker *et al.*, 2004; Van-der-Meijden *et al.*, 2004), incluyendo a los peces (Hardman, 2002, 2004; Hardman and

Page, 2003; López *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2000). Por su parte, el gen activador de la recombinación (*RAG1*), como muchos otros genes nucleares, cuenta con una baja tasa evolutiva y está presente en todos los vertebrados con mandíbula (Sullivan *et al.*, 2006; Shedko *et al.*, 2012). Además, desempeña un papel muy importante en la recombinación de inmunoglobulinas y genes receptores de células T (Tokunaga *et al.*, 2017). No obstante, la secuencia de este gen ha demostrado ser muy informativa en cuanto a análisis filogenéticos para una gran variedad de grupos taxonómicos (Bufalino y Mayden, 2010). De acuerdo con Schönhuth *et al.* (2012), los análisis con genes mitocondriales y nucleares son un esfuerzo por entender mejor la historia evolutiva de especies con base en su geografía y sistemática.

I.3 Código de barras del ADN

El reconocimiento de la identidad de las especies y por consecuencia de la diversidad en general resulta útil para su conservación y para el manejo de sus poblaciones y, dado que existe una gran parte de la biodiversidad que aún es desconocida, se requieren métodos eficaces para la identificación de las especies. Es por eso por lo que las herramientas moleculares se han determinado como la base para los nuevos análisis taxonómicos.

Una de estas herramientas moleculares más empleadas es el Código de barras del ADN, que utiliza el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (*COXI*), el cual es el gen por excelencia para análisis de identidad específica en vertebrados. Se utiliza para la identificación y reconocimiento de especies animales, siendo los peces uno de los grupos más estudiados, ya que se han analizado una gran cantidad de estos organismos bajo este enfoque (April *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2011; Ward, 2012). Además, busca identificar especies ya descritas tomando como base este marcador mitocondrial dado que presenta una baja tasa mutacional en un número aproximado de sus primeras 650 pb (Yi *et al.*, 2017). Sin embargo, un estudio de código de barras debe contener un segmento de ADN similar entre los organismos estudiados, pero diferente entre especies (Ballesteros-Córdova *et al.*, 2019). La iniciativa del código de barras de ADN dependía inicialmente en gran medida de métodos basados en distancias genéticas, sin embargo, este tipo de análisis actualmente solo emplea una clasificación diagnóstica e inferencial de los grupos taxonómicos (Sarkar *et al.*, 2008; Ballesteros-Córdova

et al., 2019). Como una alternativa, Sarkar *et al.* (2008) desarrollaron un enfoque basado en caracteres por medio de CAOS (por sus siglas en inglés), el cual identifica las reglas de clasificación, que a su vez se basan en una organización jerárquica existente, clasificando taxones u organismos sin necesitar enfoques filogenéticos (Kelly *et al.*, 2007; Rach *et al.*, 2008).

Este enfoque basado en caracteres se desarrolla en dos partes, primero se establecen los códigos de barras, es decir, que se identifican las especies tomando en cuenta caracteres diagnósticos. Una vez realizado el diagnóstico, un lector de códigos de barras de ADN clasifica las muestras de consulta desconocidas en función de los diagnósticos de códigos de barras de ADN previamente identificados. Dicho lector solo considera el número de posiciones diagnósticas relevantes para una clasificación en particular. De esta manera, el software CAOS identifica cambios diagnósticos en secuencias de ADN y establece “reglas” para leer secuencias de ADN de especímenes de consulta e identificarlas para así conocer sus especies correspondientes (Sarkar *et al.*, 2008). Con base en lo anterior, el código de barras mediante CAOS se basa en un enfoque taxonómico clásico que toma en cuenta los atributos puros, es decir, aquellos que se encuentran presentes en todos los miembros de un clado (autoapomorfía) y se consideran novedades evolutivas sin compartir. Y los privados, que son novedades evolutivas compartidas y están presentes solo en algunos de los miembros del clado (sinapomorfía) a nivel individuo. Esta técnica busca avanzar en la identificación y en el descubrimiento de nuevas especies mediante el análisis de patrones de divergencia entre secuencias utilizando el gen mitocondrial *COXI* para la identificación de especies en diversos linajes animales (Steinke *et al.*, 2009). Es por ello por lo que, el uso de herramientas moleculares y bioinformáticas para llevar a cabo estudios de identidad específica, en las poblaciones de *A. chrysogaster* en su distribución natural de manera conjunta e individual lograrán proporcionar las bases para la identidad específica por unidad geográfica, información necesaria para la creación de un plan de manejo y conservación para la especie en toda su distribución.

I.4 Variabilidad genética de la especie

La variación de genes mitocondriales se ha utilizado ampliamente en peces a lo largo del tiempo debido a que el ADNmt evoluciona de 5 a 10 veces más rápido que el ADN nuclear, además tiene la capacidad de almacenar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de interés en corto tiempo, lo que lo convierte en un marcador molecular de gran efectividad (Avise, 1994).

Los estudios de variabilidad genética ayudan a comprender la estructura poblacional de las especies, así como la integridad de las poblaciones en general. Una herramienta para ello es el gen mitocondrial *ND2*, el cual se ha utilizado ampliamente para estudios de variabilidad genética en ciprínidos (Broughton y Gold 2000, Cashner y Bart 2010). Varios autores han utilizado este marcador molecular para el estudio de estructura genética tanto intraespecífica como interespecífica para especies de la familia Cyprinidae, ya que este gen presenta una alta tasa de mutación y por lo tanto una gran variación (George *et al.*, 2008; Schönhuth *et al.*, 2015; Ballesteros-Córdova *et al.*, 2019).

Para *A. chrysogaster*, no existen hasta el momento estudios de su variabilidad genética reportados tanto para las poblaciones en México y en los EUA, por lo tanto, este sería el primer trabajo que aborda este tema.

II. HIPÓTESIS

Las poblaciones del pupo panza verde *A. chrysogaster* en su distribución geográfica en Sonora revelarán su afinidad filogenética e identidad específica por medio de la variación de los genes mitocondriales *Cyt-b* y *COXI* y el gen nuclear *RAG1*, así como la variabilidad genética de sus poblaciones por el gen mitocondrial *ND2*.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Determinar la afinidad filogenética y la identidad específica de las poblaciones del pupo panza verde *A. chrysogaster* en Sonora a partir de la variación de sus genes mitocondriales *Cyt-b* y *COXI* y su gen nuclear *RAG1* y la variabilidad genética de sus poblaciones con el gen mitocondrial *ND2*.

III.2. Objetivos particulares

1. Analizar las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *A. chrysogaster* estudiadas a partir de los genes mitocondriales *Cyt-b*, *COXI* y su concatenado y, el gen nuclear *RAG1*.
2. Corroborar la identidad específica de las poblaciones de *A. chrysogaster* a partir del código de barras del ADN con el gen mitocondrial *COXI*.
3. Determinar la variabilidad genética de las poblaciones de *A. chrysogaster* por medio del gen mitocondrial *ND2*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Recolecta de ejemplares

Se recolectaron un total de 80 ejemplares y puntas de aletas en las cuencas de los ríos de la Concepción (Río Magdalena y Arroyo Agua Caliente), en la cuenca del Río Santa Cruz y en el refugio de *Agosia chrysogaster* del CEDO en Puerto Peñasco. Sonora (Tabla 1, Figura 1) bajo la licencia de recolecta SGPA/DGVS/01686/21. Todos los peces fueron recolectados en sus hábitats naturales con electropesca (Coffelt BP – 6) en cada localidad realizando transectos de aproximadamente 100 a 200 m por arroyo muestreado. Sólo en el refugio del CEDO se utilizaron 4 trampas para peces (G-minnow traps) donde se capturaron un total de 96 individuos en un periodo de 16 horas de permanencia de las trampas en el interior del refugio. De estos 96 individuos capturados solo se seleccionaron cinco individuos de referencia completos para muestra e ingreso a la colección de peces nativos del DICTUS y 15 individuos fueron muestreados vivos para corte de puntas de aletas pélvica y pectoral derechas y posteriormente regresados vivos al estanque del refugio.

Para todos los ejemplares recolectados se tomaron muestras de tejido de la aleta pélvica derecha y fueron individualmente etiquetadas y preservadas en etanol absoluto en tubos Eppendorf de 1.5 ml. En el refugio del CEDO se recolectaron 5 ejemplares completos que fueron fijados en etanol absoluto y además 15 puntas de aletas de ejemplares vivos que se regresaron al refugio para no promover un impacto en la población del refugio. Las muestras de tejido fueron transportadas al laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS y depositadas en la colección de tejidos a -20° C. El resto de los organismos completos fueron fijados en formol al 10% y preservados en etanol al 50 % para ser depositados en la Colección de Peces Nativos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

Tabla 1. Localidades de recolecta para los ejemplares de *Agosia chrysogaster* en este estudio para análisis moleculares. USON = Universidad de Sonora, Hermosillo.

Localidad	Número de catálogo	N° de organismos analizados
1.- Cuenca del Río de la Concepción, subcuenca Río Magdalena, Río Magdalena en el vado, al cruce con el camino a Terrenate, Son. 30°38'25''N, 110°57'58''O	USON-425	19
2.- Cuenca del Río de la Concepción, subcuenca Río Magdalena, Río Magdalena en el Arroyo Agua Caliente, a 1km de carretera Ímuris-Nogales, Sonora. 30° 57' 09"N, 110° 51' 23"O	USON-1426	11
3.- Cuenca del Río Santa Cruz, Río Santa Cruz en Mascareñas, Sonora, carretera Nogales-Santa Cruz. 31°17'36"N, 110° 49'19"O	USON-1433	30
4.- Cuenca del Río Sonoyta, Refugio de <i>Agosia chrysogaster</i> en CEDO en Puerto Peñasco, Sonora. Se recolectaron 5 ejemplares completos y 15 puntas de aletas de ejemplares que se regresaron vivos al refugio	USON-1439	20

IV.2. Extracción de ADN y amplificación de genes mediante PCR

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 25 mg de tejido de aletas homogenizadas correspondientes a todas las muestras obtenidas. El producto de la homogenización fue digerido con proteinasa K y ARNasa, obteniendo el ADN precipitado con etanol de acuerdo con el kit Dneasy Blood & Tissue kit de Qiagen. La calidad y pureza del ADN se determinó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 con absorbancias de 260 y 280 nm y también visualmente por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

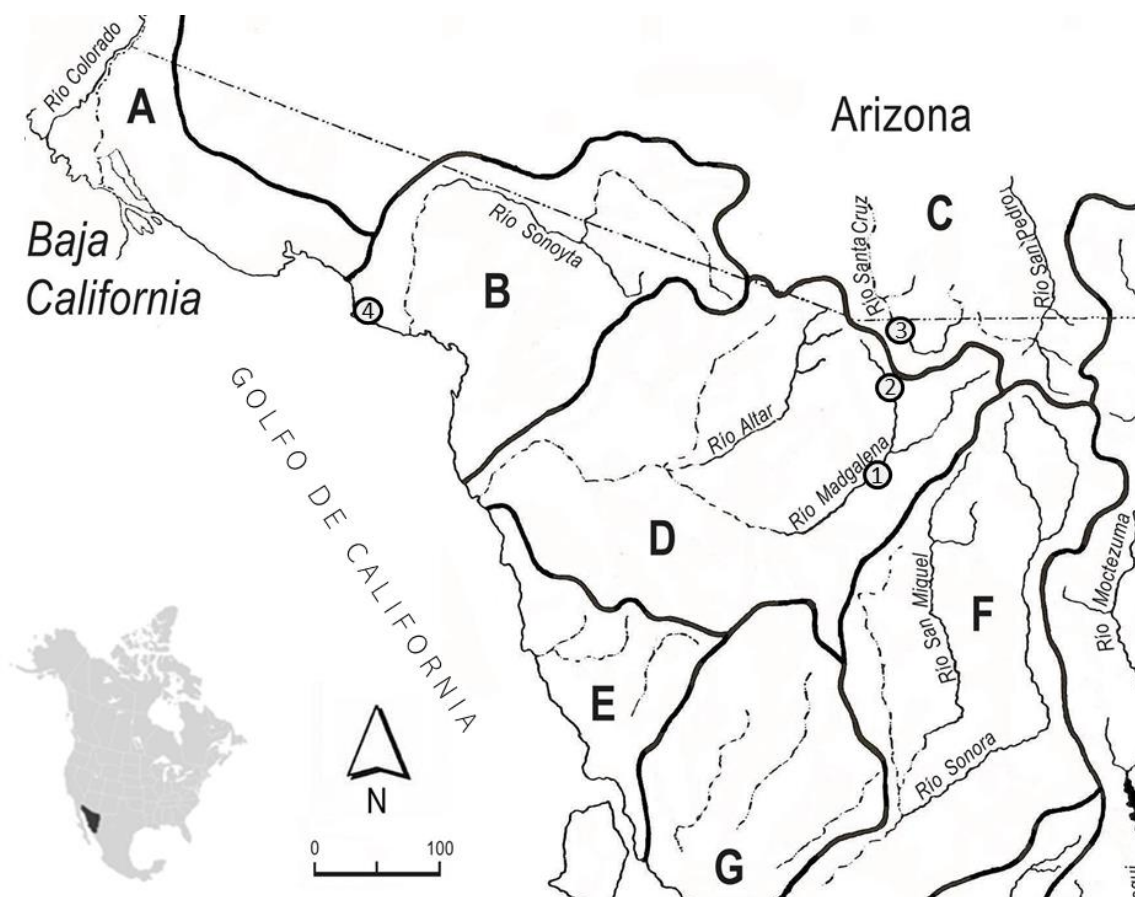


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de recolecta para los ejemplares de *A. chrysogaster* analizados en el presente estudio. Los círculos con números en su interior indican las localidades de recolecta de la tabla 1, excepto para el Río Sonoyta. Las divisiones hidrográficas son representadas por líneas gruesas. Las líneas discontinuas indican cursos de agua intermitentes. A = Cuenca del Río Colorado, B = Cuenca del Río Sonoyta, C = Cuenca del Río Gila, D = Cuenca del Río de la Concepción, E = Cuenca del Río San Ignacio, G = Cuenca del Río Bacoachi, F = Cuenca del Río Sonora.

Las reacciones de PCR realizadas se llevaron a cabo mediante la solución GoTaq® Colorless Master Mix (Promega Corporation). La amplificación del gen *Cytb* se realizó 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) con condiciones que comprenden una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94° C seguida de 35 ciclos de 50 segundos a 94° C y una temperatura de alineamiento de 45° C por 50 segundos, seguido de 2 minutos a 72° C y una extensión final de 7 minutos a 72° C.

En el resto de los genes se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación. En el caso del gen *ND2* se amplificó a partir de 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. La amplificación se realizó a partir de una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94° C seguida de 35 ciclos de 50 segundos a 94° C, 50 segundos de temperatura de alineamiento a 60° C, seguido de 2 minutos a 72° C y una extensión final de 7 minutos a 72° C. La región del código de barras del ADN del gen *COI* se amplificó 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* incluyen 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. Los oligonucleótidos para amplificar el gen *RAG1* fueron RAG1(3)'F1483I 5'- CTC AGC TGT AGC CAG TAC CAC AAA ATG-3' y como reverse RAG1(3') R3055 5'-TGA GCC TCC ATG AAC TTC TGA AGr TAY TT-3', obtenidos de Sullivan *et al.* (2006). La amplificación de este gen se realizó mediante una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de otra desnaturalización a 94 °C por 50 segundos, posteriormente, el alineamiento se llevó a cabo a 53 °C durante 50 segundos, seguido de 2 minutos a 72 °C y 34 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 50 segundos, alineamiento a 53 °C por 50 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos), seguido de una extensión final a 72 °C por 7 minutos.

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y se enviaron a MacroGen Inc. en Seúl, Corea del Sur, para su purificación y secuenciación Sanger en ambos sentidos de la cadena. Las secuencias nucleotídicas de todos los genes secuenciados se editaron utilizando ChromasPro versión 2.1 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Posteriormente se realizó un análisis de similitud de secuencias en BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para comparar las secuencias obtenidas con las existentes en GenBank. Por último, las secuencias se alinearon en Clustal W para observar la variación entre las secuencias analizadas.

IV.3 Análisis filogenéticos para el linaje de *A. chrysogaster*

Los análisis filogenéticos de *A. chrysogaster* incluyen secuencias de todas las poblaciones recolectadas de las cuencas y de secuencias utilizadas por Schönhuth *et al.* (2012) para la inferencia filogenética del género y de las relaciones geográficas postuladas hasta el momento (Tabla 2). Las relaciones filogenéticas de *A. chrysogaster* en todas sus poblaciones primeramente fueron evaluadas con nuestras secuencias del gen *Cyt-b* contra las secuencias utilizadas por Schönhuth *et al.* (2012). Posteriormente las relaciones evolutivas fueron reevaluadas con el concatenado de las secuencias de los genes mitocondriales obtenidas en este estudio (*Cyt-b* y *COXI*) y otros congéneres disponibles en el GenBank. Además, se aplicaron estas aproximaciones cladistas con el gen nuclear *RAG1*.

Toda la inferencia filogenética fue resuelta con los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Para la determinación del modelo más óptimo de sustitución de nucleótidos para el análisis de ML se utilizaron 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), resultando un modelo TrN + I + G para los genes mitocondriales y K80+G para *RAG1*. Estos modelos se utilizaron para el cálculo de los valores y la topología de los árboles a partir en una búsqueda de ML utilizando el cuchillo de Jack (Jackknife) para un árbol de alta verosimilitud con el programa PAUP* (Swofford, 2002). Este árbol se utilizó como el árbol inicial para el análisis de remuestreo no paramétrico (Bootstrap) de 1,000 pseudo réplicas para estimar el soporte de nodos en el análisis de ML. El análisis de Inferencia Bayesiana (IB) se realizó mediante una búsqueda de 4 cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) simultáneas de 5 millones de ciclos en Mr Bayes. La cadena de Markov fue muestreada a intervalos de 100 generaciones. La estabilidad de la probabilidad logarítmica se alcanzó después de 100.000 generaciones. Los primeros 1000 árboles fueron descartaron (Burn-in) en cada análisis. El soporte para los nodos del árbol de IB se determinó en función de los valores de las probabilidades posteriores bayesianas. Todos los árboles finales de ML e IB fueron visualizados y editados en FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014).

Tabla 2. 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. *A. chrysogaster* = *Agosia chrysogaster*, *A. lacustris* = *Algansea lacustris*, *A. amecae* = *Algansea amecae*, *A. avia* = *Algansea avia*, *A. monticola* = *Algansea monticola*, *Y. alta* = *Yuriria alta*, *C. funduloides* = *Clinostomus funduloides*, *E. monachus* = *Erimonax monachus*.

Taxón	Localidad	Gen	No. de acceso	Número de catálogo	Referencia
<i>A. chrysogaster</i>	1 y 2	<i>Cytb</i>	En Proceso	USON-1425-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1425-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-2	Este estudio
		<i>COX1</i>	JX442999		
			En Proceso	USON-1425-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1425-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-3	Este estudio
			HQ556979		
		<i>RAG1</i>	En Proceso	USON-1425-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1425-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1425-3	Este estudio
			En Proceso	USON-1425-4	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-3	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-4	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-5	Este estudio
			En Proceso	USON-1426-6	Este estudio
<i>A. chrysogaster</i>	3	<i>Cyt-b</i>	En Proceso	USON-1433-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-2	Este estudio

			En Proceso	USON-1433-3	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-4	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-5	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-6	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-7	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-8	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-9	Este estudio
		<i>COX1</i>	En Proceso	USON-1433-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-3	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-4	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-5	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-6	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-7	Este estudio
		<i>RAG1</i>	En Proceso	USON-1433-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-3	Este estudio
			En Proceso	USON-1433-4	Este estudio
<i>A. chrysogaster</i>	4	<i>Cytb</i>	En Proceso	USON-1439-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1439-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1439-3	Este estudio
		<i>COX1</i>	En Proceso	USON-1439-1	Este estudio
		<i>RAG1</i>	En Proceso	USON-1439-1	Este estudio
			En Proceso	USON-1439-2	Este estudio
			En Proceso	USON-1439-3	Este estudio
			En Proceso	USON-1439-4	Este estudio
		<i>Cyt-b</i>	EU082506	MNCN-302526	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
		<i>COX1</i>	MG806729	MNCN-302526	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
<i>A. lacustris</i>	Lago Pátzcuaro, Río Lerma, Michoacán	<i>RAG1</i>	EU082597	UAIC-8352	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
<i>A. amecae</i>	No disponible	<i>Cyt-b</i>	FJ913812	No disponible	Schönhuth <i>et al.</i> (2018)
	No disponible	<i>COX1</i>	MG806727	MNCN3696	Schönhuth <i>et al.</i> (2018)
<i>A. avia</i>	Río Compostela, Cuenca R. Chila., Nayarit	<i>Cyt-b</i>	EU082509	STL 1106.01	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)

	Río Compostela, Cuenca R. Chila., Nayarit	<i>COX1</i>	EU082509	STL 1106.01	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
	Río Compostela, Cuenca R. Chila., Nayarit	<i>RAG1</i>	EU082590	STL 1106.01	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
<i>A. monticola</i>	Río Santiago, Centro México	<i>Cyt-b</i>	FJ913790	No disponible	Pérez-Rodríguez <i>et al.</i> (2009)
	No disponible	<i>COX1</i>	MG806728	SLUM1106	Schönhuth <i>et al.</i> (2018)
	Río Bolaños, Cuenca Gde. Santiago, Zacatecas	<i>RAG1</i>	JX443341	UANL 18775	Schönhuth <i>et al.</i> (2012)
<i>E. monachus</i>	No disponible	<i>Cyt-b</i>	GQ275172	UAIC 10655.02	Schönhuth y Mayden (2010)
	No disponible	<i>COX1</i>	MG806753	UAIC10655.02	Schönhuth <i>et al.</i> (2018)
<i>Y. alta</i>	Río Juchipila, Cuenca Gde. Santiago, Zacatecas	<i>Cyt-b</i>	EU082475	MEX 15	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
	No disponible	<i>COX1</i>	MG806810	MNCN3809	Schönhuth <i>et al.</i> (2018)
	Río Lerma	<i>RAG1</i>	EU082582	MNCN 3324	Schönhuth <i>et al.</i> (2008)
<i>C. funduloides</i>	Mill Creek, Cuenca Santee River	<i>Cyt-b</i>	JX442999	UAIC 7920.02	Schönhuth <i>et al.</i> (2012)
	No disponible	<i>COX1</i>	MG806735	UAIC 10774.02	Schönhuth <i>et al.</i> (2018)
	No disponible	<i>RAG1</i>	GU136294	UAIC 10774.02	Schönhuth y Mayden (2010)
<i>R. osculus</i>	Oregon Lakes Wall Canyon, Nevada	<i>Cyt-b</i>	KY399011	No disponible	Smith <i>et al.</i> (2017)
	No disponible	<i>COX1</i>	KX145309	NXG2014132	No disponible
	South Fork Zumbro River (Zumbro – Mississippi River)	<i>RAG1</i>	KF640174	No disponible	Kim y Conway (2014)

IV.4. Análisis de Código de barras del ADN de *A. chrysogaster*

Se analizó el código de barras del ADN basado en caracteres con el gen *COXI* para todos los individuos de *A. chrysogaster* recolectados en las cuencas de distribución natural y en el refugio del CEDO en Puerto Peñasco, utilizando como grupo externo al género *Algansea*, reportado por varios autores como su género hermano (Schönhuth *et al.*, 2006; Schönhuth *et al.*, 2012; Schönhuth *et al.*, 2014). Inicialmente se realizó un análisis de distancias genéticas estimado con el modelo de Kimura-2 parámetros (K2P) y por medio de vecino más cercano (Neighbor-joining) en PAUP*. El árbol obtenido fue incorporado al archivo NEXUS de la matriz de secuencias de las poblaciones de *A. chrysogaster* analizadas por medio del software Mezquite v3.10 (Maddison y Maddison, 2016). El archivo NEXUS/TREE fue editado según Jörger and Schrödl (2014) y ejecutado en el software CAOS (Sarkar *et al.*, 2008) para obtener el código de barras basado en caracteres de los especímenes de las poblaciones analizadas.

IV.5. Análisis de variabilidad genética de las poblaciones del linaje de *A. chrysogaster*

La variabilidad genética de las poblaciones de *A. chrysogaster* se desarrolló utilizando el gen mitocondrial *ND2* y considerando las tres poblaciones conformadas por especímenes de las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y Sonoyta (Refugio del CEDO). Las poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción incluyeron las localidades 1 Arroyo Agua Caliente (n = 11) y 2 Río Magdalena (n = 19), la población de la Cuenca del Río Santa Cruz fue la localidad 3 en Mascareñas (30) y por último la Cuenca del Río Sonoyta en la localidad 4 Refugio del CEDO en Puerto Peñasco (n = 20) (Tabla 1, Figura 1).

La variabilidad genética para las poblaciones de *A. chrysogaster* en las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y Sonoyta (Refugio del CEDO) se analizó con el programa Arlequín 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) donde se estimó la diversidad de genes, número de loci analizados, sitios polimórficos (S), diversidad nucleotídica, frecuencia haplotípica y análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 2005) considerando 10,000 permutaciones para corroborar la significancia estadística. Se implementó el criterio de datos mitocondriales en la AMOVA por medio de una matriz de distancias de medias pareadas (Excoffier *et al.*, 1992). El valor obtenido del coeficiente de

diferenciación genética (F_{st}) en el análisis de AMOVA se probó con la hipótesis $F_{st} = 0$ mediante 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). Adicionalmente se estimó el número de migrantes por generación de acuerdo con $N_e m = (F_{st}^{-1} - 1/2)$ (Hartl, 1988).

V. RESULTADOS

V.1 Variación en las secuencias del gen mitocondrial *Cyt-b* para las poblaciones de *Agosia chrysogaster*

Se amplificaron 989 pb del gen *Cytb* para todos los especímenes recolectados del refugio del CEDO y de las cuencas de los ríos de la Concepción y Santa Cruz. Se observó una transición A por G en la posición 496 para los individuos del refugio del CEDO. Se detectaron 15 haplotipos para las tres localidades, solo uno de ellos fue compartido entre las cuencas de los ríos de la Concepción y Santa Cruz, cuatro fueron exclusivos para el refugio del CEDO y ocho también lo fueron para la cuenca del Río Santa Cruz (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las frecuencias haplotípicas del gen *Cyt-b* para las poblaciones analizadas de *Agosia chrysogaster* en el Noroeste de México. H = haplotipos.

H	Cuenca del Río de la Concepción		Cuenca del Río Santa Cruz	Cuenca del Río Sonoyta
	Agua Caliente	Magdalena		
1	4	5		
2	2	7	1	
3				1
4				2
5				1
6		3		
7		1		
8			1	
9			1	
10			1	
11			1	
12			1	
13			1	
14			1	
15			1	
Total	6	16	9	4

V.2. Relaciones filogenéticas para las poblaciones de *Agosia chrysogaster*

Las inferencias filogenéticas de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) con el gen *Cytb* para *A. chrysogaster* resolvieron a todas las poblaciones como un grupo

monofilético con la misma topología y con variaciones en los valores de bootstrap (BP) y probabilidades posteriores (PP) (Figura 2). Las posiciones variables fueron 253 y de ellas 82 fueron parsimoniosamente informativas. Todos los individuos de las tres cuencas hidrológicas se agruparon en un clado junto con la secuencia de GenBank (JX443014) de la especie reportada para Arizona, con valores de BP 65 % y PP 100 %. Hasta ahora, el clado monofilético de *A. chrysogaster* se presenta como grupo hermano del género *Algansea* spp. y este a su vez, hermano de los géneros *Yuriria* (FJ913791Yalta) y *Erimonax* (EU082475Emonachus, Figura 2) con valores altos de BP (86 %) y PP (100 %).

Los análisis filogenéticos de ML e IB con el concatenado de los genes mitocondriales *Cytb* y *COXI* resultaron en topologías muy similares para los árboles obtenidos, pero con diferencias en los valores de BP para ML y PP para IB (Figura 3), evidenciando la monofilia de las poblaciones de *A. chrysogaster* para el noroeste de México (BP = 100 %, PP = 100%) y con un clado geográfico sólo para la cuenca del Río Sonoyta (Refugio del CEDO) (BP = 100%, PP = 100%) (Figuras 2 y 3). El clado hermano para *A. chrysogaster* fue el género *Algansea* con valores de soporte elevados (BP = 96 %, PP = 100%). El grupo hermano a este clado mexicano resultaron ser los géneros *Yuriria* y *Erimonax* igualmente con valores altos de BP (98 %) y PP (100 %) (Figura 3).

Las inferencias filogenéticas con el gen nuclear *RAG1* para las poblaciones de *A. chrysogaster* fueron resueltos por ML e IB y se detectó nuevamente monofilia entre las poblaciones de *A. chrysogaster* con las secuencias del GenBank utilizadas y similitud con la topología de *Cytb* mitocondrial (Figura 4). Se detectaron 14 haplotipos donde sólo los haplotipos 12 y 13 se compartieron en las dos localidades de Río de la Concepción (Tabla 4, AC y M). Las posiciones variables fueron 91 y de ellas 39 fueron parsimoniosamente informativas y todos los individuos de *A. chrysogaster* formaron un clado con las secuencias reportadas en GenBank con valores altos de BP (100 %) y PP (100 %). Igualmente, el clado monofilético de *A. chrysogaster* se presenta como hermano de especies del género *Algansea* y este a su vez, hermano de los géneros *Yuriria* (FJ913791Yalta) con valores altos de BP (100 %) y PP (100 %).

Tabla 4. Distribución de las frecuencias haplotípicas del gen *RAG1* para las poblaciones analizadas de *Agosia chrysogaster* en el Noroeste de México. H = haplotipos.

	Cuenca del Río de la Concepción		Cuenca del Río Santa Cruz	Cuenca del Río Sonoyta
H	Agua Caliente	Magdalena		
1			1	
2			1	
3			1	
4				1
5	1			
6	1			
7		2		
8	1			
9				1
10	1			
11				1
12	1	4		
13	1	1		
14		5		
15				
Total	6	12	3	3

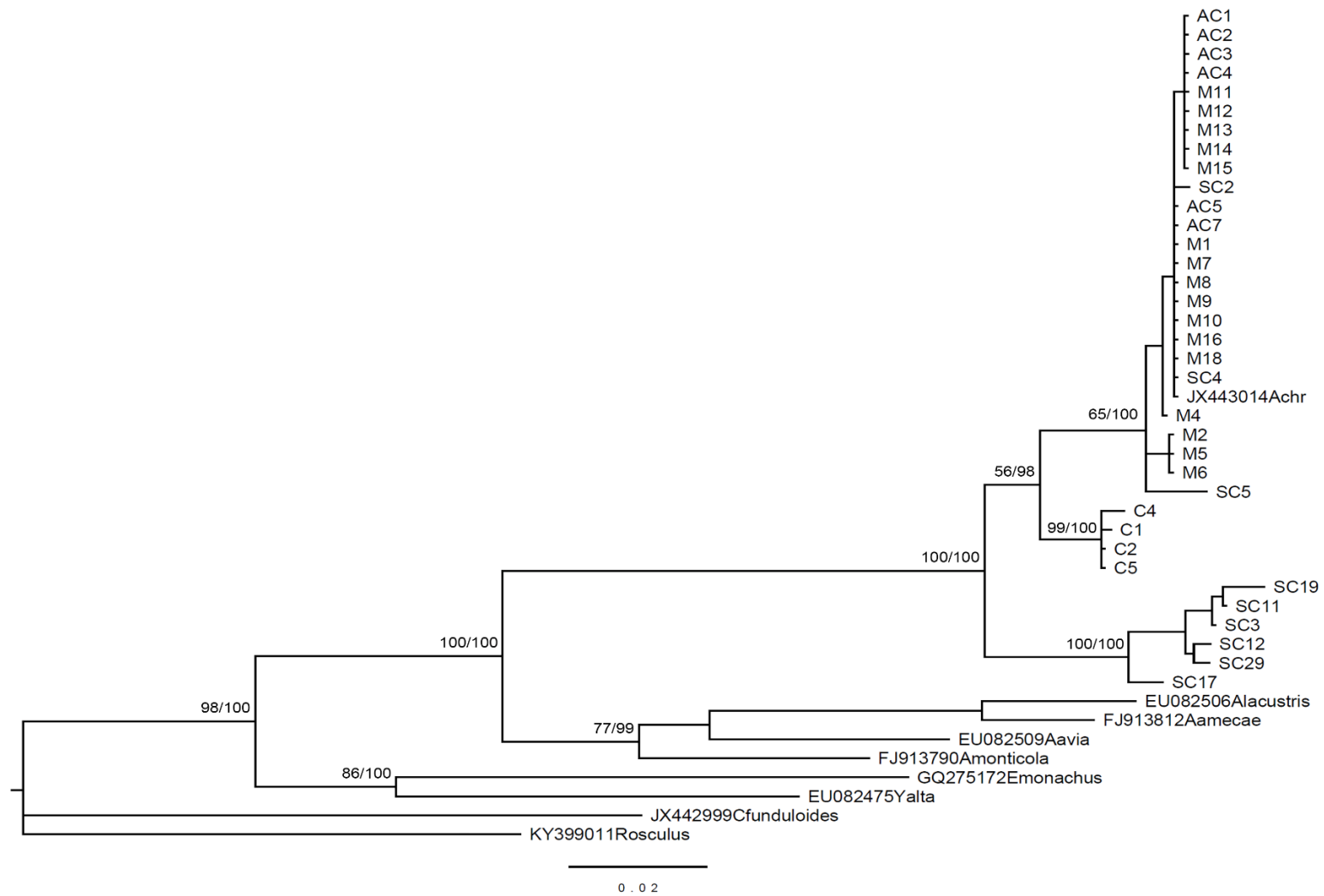


Figura 2. Árbol filogenético con el gen *Cyt-b* resuelto por IB con el modelo evolutivo TrN+I+G para 35 integrantes de *A. chrysogaster* de las cuencas de los ríos bajo estudio y de miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012). Cuenca del Río de la Concepción: AC =Agua Caliente, M = Magdalena; SC = Cuenca del Río Santa Cruz; Cuenca del Río Sonoyta: Refugio del CEDO = C.

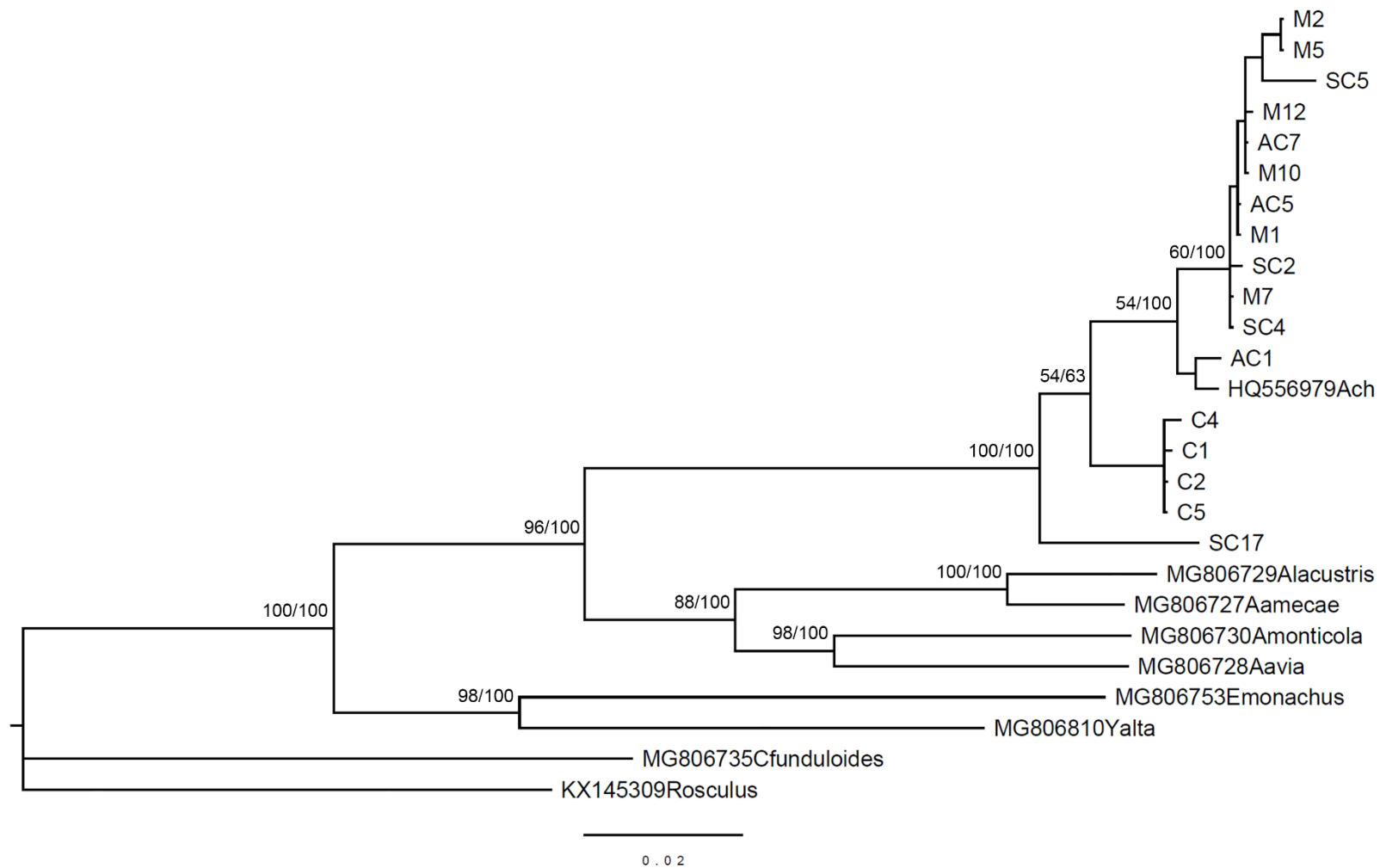


Figura 3. Árbol filogenético con el concatenado de los genes *Cyt-b* y *COXI* resuelto por Inferencia Bayesiana con el modelo evolutivo TrN+I+G para 17 integrantes de *A. chrysogaster* de las cuencas de estudio, además de otros miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012). Cuenca del Río de la Concepción: AC =Agua Caliente, M = Magdalena; SC = Cuenca del Río Santa Cruz = SC; Cuenca del Río Sonoyta: Refugio del CEDO = C.

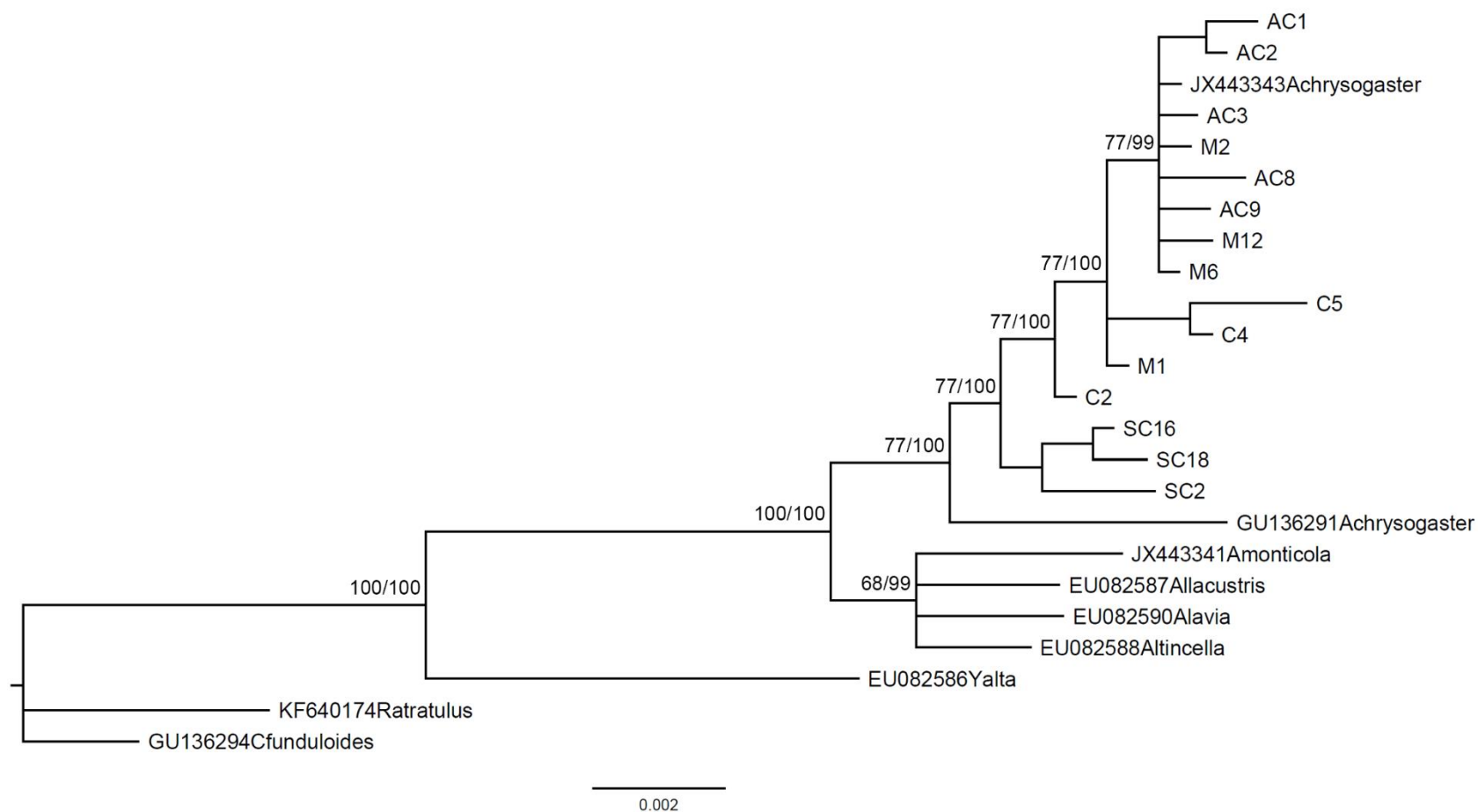


Figura 4. Árbol filogenético con el gen RAG1 resuelto por Inferencia Bayesiana (modelo de evolución K80+G) para 21 integrantes de *A. chrysogaster* de las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y el refugio del CEDO, además de otros miembros del Clado Occidental Redefinido (Schönhuth *et al.*, 2012). Cuenca del Río de la Concepción: AC =Agua Caliente, M = Magdalena; SC = Cuenca del Río Santa Cruz = SC; Cuenca del Río Sonoyta: Refugio del CEDO = C.

V.3. Análisis del código de barras del ADN de las poblaciones de *Agosia chrysogaster*

El análisis de 64 secuencias del gen *COXI* para *A. chrysogaster* de las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y Sonoyta (Refugio del CEDO) resultó en 10 haplotipos, de estos sólo tres haplotipos se compartieron entre las localidades de las cuencas de los ríos de la Concepción y Santa Cruz, esta última mostró seis haplotipos exclusivos y solo el refugio del CEDO con la población remanente del Río Sonoyta presentó haplotipos exclusivos para los cinco individuos analizados (Tabla 5). La diversidad haplotípica para la especie fue de 0.885 (Desviación estándar = 0.00086) y la de nucleótido de y 0.01511 (Desviación estándar = 0.00165) respectivamente.

Tabla 5. Distribución de las frecuencias haplotípicas del gen *COI* para las poblaciones de *Agosia chrysogaster* en el Noroeste de México analizadas. H = haplotipos.

H	Cuenca del Río de la Concepción		Cuenca del Río Santa Cruz	Cuenca del Río Sonoyta
	Agua Caliente	Magdalena		
1				5
2	1		1	
3	1	1		
4	1	4		
5	1	1	5	
6	1		3	
7			1	
8			1	
9			2	
10			1	
Total	5	6	14	5

El árbol de distancias genéticas por NJ con K2P resolvió a todos los individuos de todas las cuencas hidrológicas de la distribución de *A. chrysogaster* en un clado monofilético y mostró como género hermano a las especies del género *Algansea* (Figura 5).

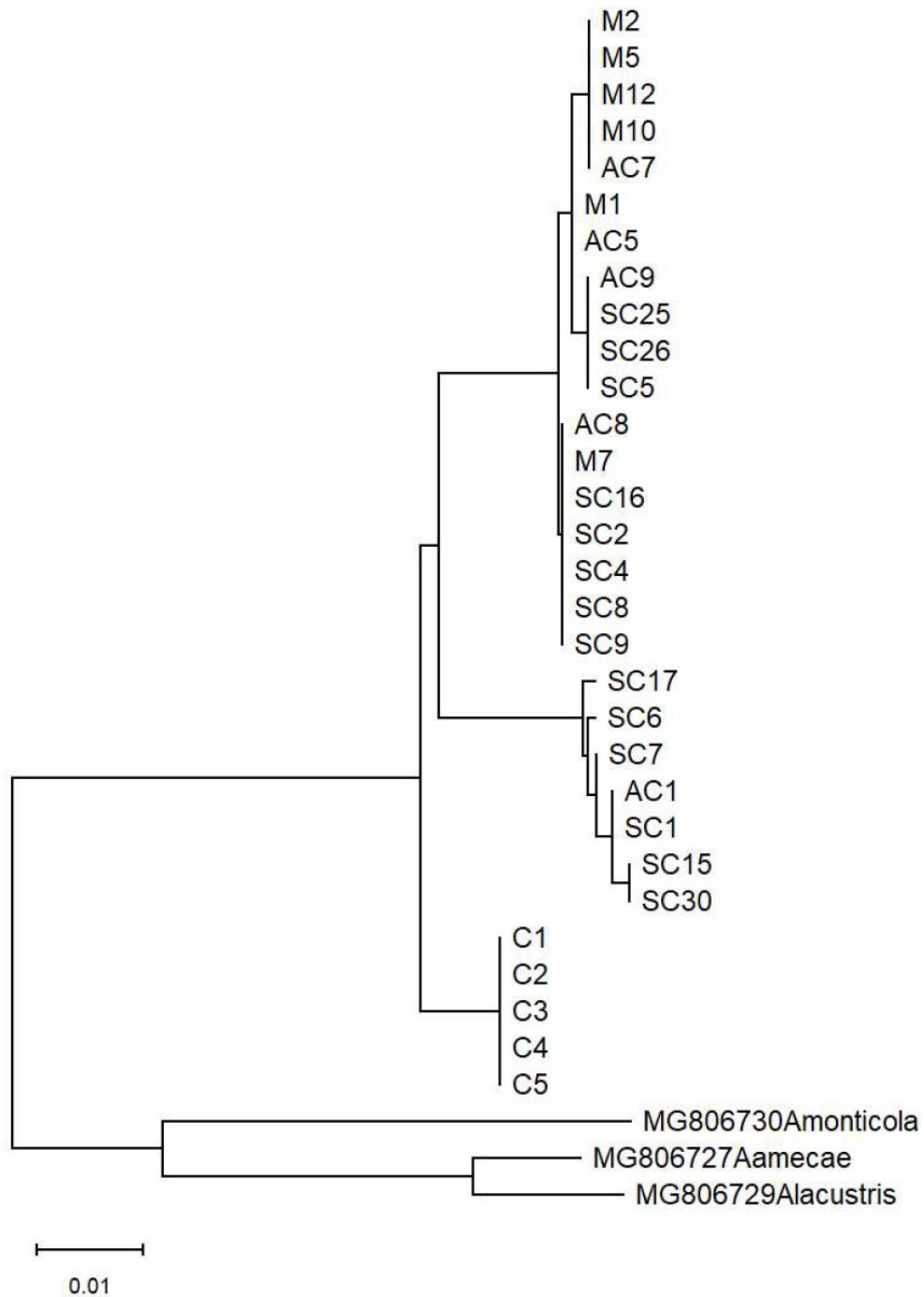


Figura 5. Árbol de distancias genéticas por K2P para el gen *COXI* de los individuos de *Agosia chrysogaster* analizados.

El análisis del código de barras del ADN basado en caracteres con CAOS mostró 18 caracteres puros individuales (sPu) para discriminar a las poblaciones de *A. chrysogaster* en toda su distribución en las cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y Sonoyta de las especies de su género hermano *Algansea* (Tabla 6). Dieciséis caracteres puros (sPu) resultaron transiciones del tipo T-C (226, 361, 434, 535, 637), C-T (268, 496, 547), G-A (349, 385, 388, 520, 634), A-G (580, 655) y sólo dos sitios fueron transversiones T-A (322) y G-C (634). Además, la población del Río Sonoyta registró una transición contra todas las especies comparadas en la posición (607) identificándose como una autoapomorfía para la población del Río Sonoyta al interior de *A. chrysogaster* (Tabla 6).

Adicionalmente y considerando sólo los individuos analizados de *A. chrysogaster* es posible observar que los individuos de la población del Río Sonoyta mantenidos en el refugio del CEDO en Puerto Peñasco muestran autoapomorfías en las posiciones 165 y 700 (T por C), 337 y 694 (A por G) y 607 (C por T), todas transiciones.

V.4. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de *Agosia chrysogaster*

Para el análisis de variabilidad genética de las poblaciones de *Agosia chrysogaster* se analizaron 64 secuencias del gen mitocondrial *ND2* todas con una longitud de 1,113 pb sin inserciones ni deleciones. Se encontraron 108 posiciones variables y 92 fueron parsimoniosamente informativas. El análisis de datos para la distribución de frecuencias haplotípicas mostró un total de 26 haplotipos distribuidos en las poblaciones analizadas. Diez haplotipos fueron únicos y el resto fueron detectados en al menos dos de las poblaciones analizadas. No se detectó ningún haplotipo compartido entre las cinco muestras del CEDO de la cuenca del Río Sonoyta con las de los ríos De la Concepción y Santa Cruz. Al interior de la cuenca del Río de la Concepción se detectaron cinco haplotipos exclusivos para la cuenca, de los cuales tres fueron compartidos entre las poblaciones de Magdalena y Agua Caliente y dos fueron exclusivos para Agua Caliente. Finalmente, se detectó un haplotipo compartido entre la localidad de Agua Caliente del Río De la Concepción y el Río Santa Cruz (Tabla 7).

Tabla 6. Código de barras del ADN para *Agosia chrysogaster* (AC1, C1, M1, SC1), *Algansea amecae*, *Algansea lacustris* y *Algansea monticola* basado en atributos característicos puros (sPu) obtenido por CAOS. En la posición 607 se marca en recuadro la Citosina que representa una autoapomorfía para la población del Refugio del CEDO provenientes del Río Sonoyta.

	226	268	322	349	361	385	388	434	498	502	520	535	547	580	607	634	637	655	664
<i>A. chrysogaster</i> AC1	T	C	T	G	T	G	G	T	C	G	G	T	C	A	T	G	T	A	T
<i>A. chrysogaster</i> C1	T	C	T	G	T	G	G	T	C	G	G	T	C	A	C	G	T	A	T
<i>A. chrysogaster</i> M1	T	C	T	G	T	G	G	T	C	G	G	T	C	A	T	G	T	A	T
<i>A. chrysogaster</i> SC1	T	C	T	G	T	G	G	T	C	G	G	T	C	A	T	G	T	A	T
<i>A. amecae</i> MG806727	C	T	A	A	C	A	A	C	T	C	A	C	T	G	T	A	C	G	A
<i>A. lacustris</i> MG806729	C	T	A	A	C	A	A	C	T	C	A	C	T	G	T	A	C	G	A
<i>A. monticola</i> MG806730	C	T	A	A	C	A	A	C	T	C	A	C	T	G	T	A	C	G	A

Tabla 7. Distribución de las frecuencias haplotípicas para el gen *ND2* de las cuatro poblaciones del linaje de *A. chrysogaster* analizadas. H = haplotipos.

H	Río Sonoyta	Río de la Concepción		Río Santa Cruz
	CEDO	Magdalena	Agua Caliente	
1			2	
2		1	1	
3		5	4	
4			2	
5		2	1	
6			1	2
7	5			
8		2		
9		1		
10		3		
11		1		
12		1		
13		1		
14		1		
15				4
16				5
17				2
18				2
19				5
20				1
21				2
22				3
23				1
24				1
25				1
26				1
Total	5	18	11	30

El análisis del perfil de red haplotípica para las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster* mostró tres haplogrupos, uno de ellos integrado solo por los individuos de la cuenca del Río Sonoyta donde se detectó solo el haplotipo 5, otro integrado por individuos de las poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción y del Río Santa Cruz (Haplotipo 6) y, el tercero integrado por individuos del Río Santa Cruz (Haplotipos 15 al 26; Tabla 7, Figura 6). La posición central en la red del haplotipo 3 integrado por individuos de las dos poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción lo sugieren como el potencial haplotipo basal del linaje de *A. chrysogaster* de donde surgen el resto de los haplotipos obtenidos para la cuenca del Río de la Concepción (Figura 6).

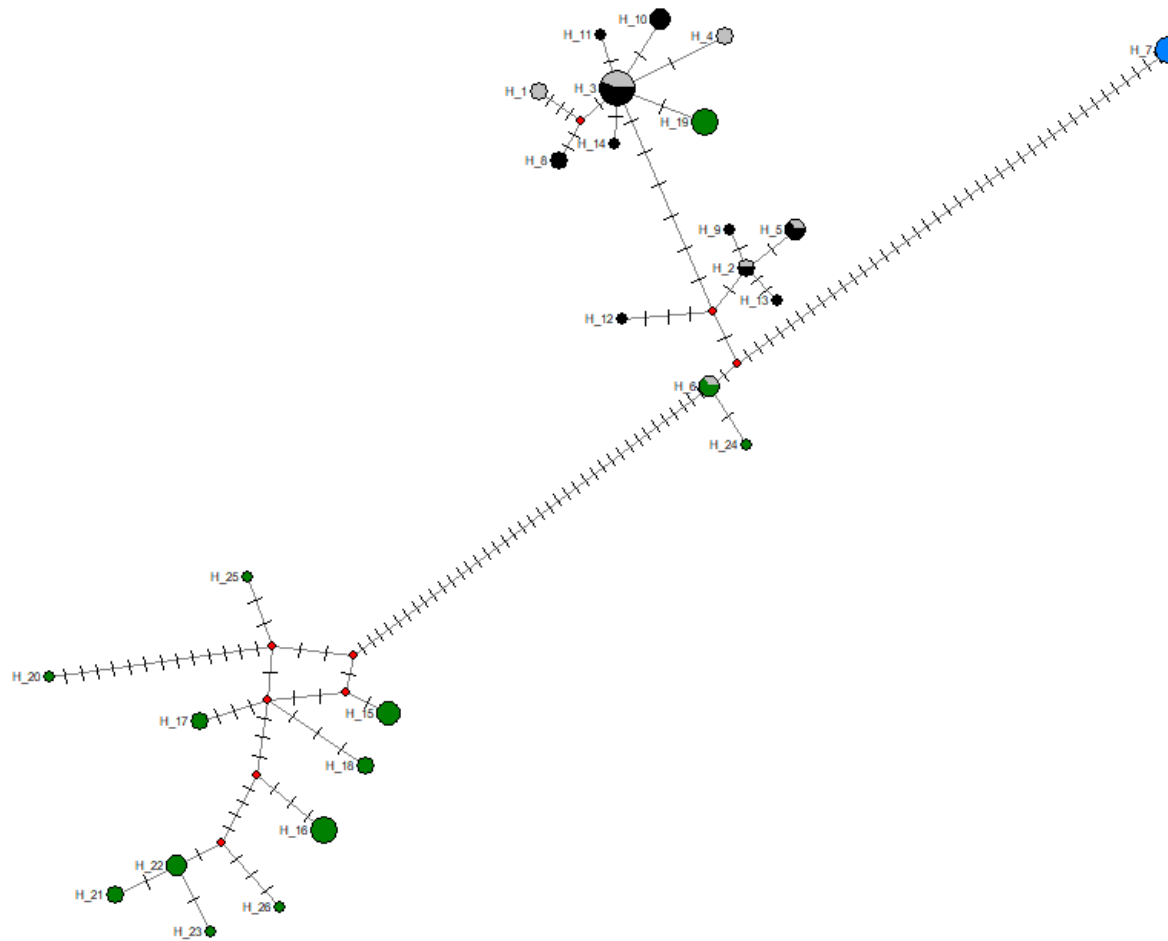


Figura 6. Perfil de red haplotípica del gen *ND2* para las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*. El tamaño de los círculos es proporcional a los organismos que presentaron el haplotipo mostrado. Los puntos rojos representan el median vector que separa a los haplogrupos resueltos. Las marcas representan el número de pasos mutacionales. Azul = CEDO, Negro = Magdalena, Gris = Agua Caliente y Verde = Río Santa Cruz.

El análisis de secuencias para las poblaciones del linaje de *A. chrysogaster* en la cuenca del Río de la Concepción mostró índices de diversidad de gen de 0.8545 (+/- 0.0852) y un valor de diversidad de nucleótido de 0.047475 (+/- 0.028116) para los individuos de la localidad Agua Caliente, mientras que las secuencias analizadas para la localidad de Magdalena mostraron valores de diversidad de gen y nucleótido de 0.9020 (+/- 0.0497) y 0.048778 (+/- 0.027647) respectivamente. Los valores de diversidad de gen y nucleótido para las dos poblaciones en conjunto de la cuenca del Río de la Concepción fueron de 0.8867 (+/- 0.0450) y 0.047756 (+/- 0.026510) respectivamente. Para la cuenca Río Santa Cruz los índices de diversidad de gen y de nucleótido mostraron valores de 0.9241 (+/- 0.0236) y 0.228182 (+/- 0.114722) respectivamente. Finalmente, para las cinco secuencias de las muestras del CEDO, cuenca del Río Sonoyta, se obtuvieron valores de 0.0000 (+/- 0.0000) para la diversidad de gen y 0.000000 (+/- 0.000000) para diversidad de nucleótido.

Los índices de diversidad molecular mostraron valores muy similares al interior de las poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción (Tabla 8). A nivel de cuenca, se observó que el Río Santa Cruz fue el que obtuvo los valores más altos en los índices de diversidad molecular, mientras que para el CEDO la diversidad fue nula, probablemente debido al bajo número de muestras empleadas.

Tabla 8. Índices de diversidad molecular para las cuatro poblaciones del linaje de *A. chrysogaster* analizadas. Ts = transiciones Tv = transversiones, Sus = Sustituciones, Spr = Sitios privados, Spo = Sitios polimórficos.

Localidad	Índice				
	Ts	Tv	Sus	Spr	Spo
CEDO	0	0	0	0	0
Magdalena	18	2	20	6	20
Agua Caliente	15	0	15	2	15
Río Santa Cruz	67	10	77	61	77

El análisis molecular de varianza (AMOVA) para las cuatro poblaciones en conjunto explicó el 61.57 % de la variación entre las poblaciones y el 38.43 % dentro de las poblaciones e indicó una F_{st} de 0.61573 ($p = 0.0000$) (Tabla 9) con un número de migrantes por generación (N_m) de 0.31. Los valores de F_{st} en el análisis pareado de todas las poblaciones del linaje *A. chrysogaster*, mostraron a las dos poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción con un bajo valor de diferenciación genética (Tabla 10) lo que sugiere la presencia de flujo genético entre ellas. Los resultados indican un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones. Adicionalmente los valores de F_{st} y N_m sugieren un alto grado de diferenciación genética entre las diferentes cuencas hidrológicas (Tabla 10, 11).

Tabla 9. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las cuatro poblaciones en conjunto del linaje de *A. chrysogaster*.

Fuente de la variación	GL	Suma de cuadrados	Varianza en los componentes	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	3	507.956	11.42347	61.57
Dentro de las poblaciones	60	427.747	7.12912	38.43
Total	63	935.703	18.55259	
$F_{st} = 0.61573$ ($p = 0.0000$)				

Tabla 10. Índices pareados de diferenciación genética (F_{st}) para las cuatro poblaciones del linaje de *A. chrysogaster*. El asterisco (*) indica $P < 0.05$.

	CEDO	Magdalena	Agua Caliente	Río Santa Cruz
CEDO	0.0000			
Magdalena	0.90971*	0.00000		
Agua Caliente	0.92205*	-0.02343	0.00000	
Río Santa Cruz	0.62727*	0.56264*	0.53018*	0.00000

Tabla 11. Número de migrantes pareados calculados por F_{st} para las siete poblaciones del linaje de *A. chrysogaster*. N/A = No se puede obtener el número de migrantes debido a un valor de F_{st} negativo.

	CEDO	Magdalena	Agua Caliente	Río Santa Cruz
CEDO				
Magdalena	0.04963			
Agua Caliente	0.04227	N/A		
Río Santa Cruz	0.29710	0.38866	0.44307	

El análisis jerárquico de varianza molecular para las tres cuencas analizadas (cuenca del Río Sonoyta (CEDO), cuenca del Río de la Concepción y cuenca del Río Santa Cruz) indicó que el 67.23 % ($F_{st} = 0.65326$, $p = 0.0000$) de la variación ocurre entre los grupos. Se encontró que el -1.90 % de la variación ocurre entre las poblaciones al interior de los grupos, sin que la diferenciación sea significativa ($F_{sc} = 0.05800$, $p = 0.49169$), indicando que no existe variación entre poblaciones, posiblemente debido a que sólo se tienen dos poblaciones en el grupo de la cuenca del Río de la Concepción. Por su parte, se encontró que el 34.67 % de la variación ocurre entre las poblaciones, sin que su diferenciación sea significativa ($F_{ct} = 0.67227$, $p = 0.15934$) (Tabla 12). 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 (> 0.50) (Tablas 13 y 14) con un bajo N_{em} entre ellas (Tablas 13 y 14). Al igual que para las cuatro poblaciones en conjunto, los resultados indican un alto grado de diferenciación genética entre las tres cuencas analizadas.

Tabla 12. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para las tres cuencas hidrológicas de las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*.

Fuente de la variación	GL	Suma de cuadrados	Varianza en los componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	506.163	13.82218	67.23
Entre poblaciones dentro de los grupos	1	1.793	-0.39079	-1.90
Dentro de las poblaciones	60	427.747	7.12912	34.67
Total	63	935.703	20.56051	
$F_{st} = 0.65326$ ($p = 0.0000$)				
$F_{sc} = -0.05800$ ($p = 0.49169$)				
$F_{ct} = 0.67227$ ($p = 0.15934$)				

Tabla 13. Índices de diferenciación genética (F_{st}) pareados para las tres cuencas hidrológicas de las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*. El asterisco (*) indica $P < 0.05$.

	CEDO	Río de la Concepción	Río Santa Cruz
CEDO	0.00000		
Río De la Concepción	0.90512*	0.00000	
Río Santa Cruz	0.62737*	0.60139*	0.00000

Tabla 14. Número de migrantes por generación (N_{em}) pareados calculados por F_{st} las tres cuencas hidrológicas de las poblaciones analizadas del linaje de *A. chrysogaster*.

	CEDO	Río de la Concepción	Río Santa Cruz
CEDO	0.00000		
Río De la Concepción	0.05241	0.00000	
Río Santa Cruz	0.29698	0.33141	0.00000

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Filogenia en las poblaciones de *Agosia chrysogaster*

La monofilia de *Agosia chrysogaster* detectada en este estudio en ejemplares de su distribución en las cuencas del noroeste de México (cuencas de los ríos de la Concepción, Santa Cruz y Sonoyta en su refugio del CEDO) está puntualmente evidenciada por las publicaciones donde se incluye a esta especie como parte de los análisis dirigidos a otras especies de la familia Cyprinidae con genes mitocondriales y nuclear utilizando ML e IB (Schönhuth *et al.*, 2006; Schönhuth *et al.*, 2012; Schönhuth *et al.*, 2014).

Las relaciones filogenéticas por ML e IB utilizando el gen mitocondrial *Cyt-b* y el gen nuclear *RAG1* inferidas en el presente estudio, soporta con valores altos de remuestreo y probabilidades posteriores su monofilia sin generar clados geográficos y, además, la baja divergencia genética detectada, pueden explicarse por aislamientos relativamente recientes en las cuencas que una vez estuvieron conectados y habitadas por miembros de esta especie, como se ha sugerido para especies del género *Gila* que se distribuyen en el Noroeste de México (Schönhuth *et al.*, 2014). Sin embargo, el árbol de los genes mitocondriales *Cyt-b* y el concatenado con *COX1*, muestra a los dos haplotipos detectados en cinco individuos de la población del Río Sonoyta como un clado independiente anidado al interior del resto de los individuos de *A. chrysogaster* analizados. Esta condición divergente de la muestra de la población en resguardo del Río Sonoyta se acentúa con la presencia de cuatro autoapomorfías (transiciones) adicionales en forma de transiciones en las posiciones 16 y 700 (T por C) y 337 y 694 (A por G).

Hendrickson (1987), además de separar morfológicamente a las poblaciones de *A. chrysogaster* en su distribución actual en las cuencas de los ríos de la Concepción, Gila y Sonoyta de las poblaciones de su congénico aún sin describirse, *Agosia* n. sp. en su distribución desde la cuenca del Río Sonora hacia el sur hasta el Río Sinaloa, generó información genética (Alozymas) que muestra rasgos únicos para la población del pupo panza verde en la Cuenca del Río Sonoyta. La presencia de un alelo único de la enzima peptidasa en dos individuos de los 65 analizados se indica como una autoapomorfía y, adicionalmente registró resultados incongruentes en su análisis morfológico, asignando el morfotipo del Río

Sonoyta al morfotipo sureño detectado para la nueva especie del género en lugar de asociarlo con el morfotipo norteño afín a la geografía de la especie. Tibbets y Dowling (1996) detectaron divergencia en la diversidad nucleotídica del *Cyt-b* entre las poblaciones del norte de la distribución de *A. chrysogaster* (Arroyo Valle Williamson, Río Verde) con respecto a las poblaciones analizadas más sureñas en Arizona restringidas al Río Gila. Debido a la falta de información sobre la variabilidad genética y la posible presencia de endogamia en las población de refugio de *A. chrysogaster* del Río Sonoyta y del resto de su distribución, los indicadores de divergencia podrían estar relacionados con el aislamiento histórico que la cuenca registra primeramente por haber pertenecido a la cuenca del Río Colorado antes que al Gila y, posteriormente, haberse separado del primero por el evento de surgimiento de la Sierra Volcánica El Pinacate (Calmus *et al.*, 2011).

VI.2 Caracteres diagnósticos para las poblaciones de *Agosia chrysogaster*

La eficacia de los métodos basados en caracteres, en este caso CAOS para la detección de taxones, se basa en el uso de caracteres diagnósticos como lo hace la taxonomía tradicional. El método basado en caracteres postula que los miembros de un determinado taxón comparten una combinación distintiva o combinaciones de atributos de caracteres diagnósticos (Autoapomorfías) que están ausentes en grupos relacionados y que pueden utilizarse para la discriminación de especies (Rach *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2009; Jörger y Schrödl, 2013). A pesar de la propuesta de utilizar más de tres caracteres como brecha de código de barras de ADN para separar agrupaciones taxonómicas naturales (Rach *et al.*, 2008), Jörger y Schrödl (2013) argumentan que CAOS no posee un criterio objetivo con el cual delimitar un número umbral de nucleótidos distintivos que indicarían un límite de especie (es decir, para delimitar una probable nueva especie) o una población independiente perteneciente a la misma especie.

El código de barras mostró 18 caracteres puros individuales (sPu) que discriminan a las poblaciones de *A. chrysogaster* en toda su distribución de las especies de *Algansea*. Nuestro análisis reveló un único polimorfismo fijo en las cinco secuencias examinadas de la población de *A. chrysogaster* del Río Sonoyta que son mantenidos en el único refugio existente en el

CEDO en Puerto Peñasco, Sonora y que estuvo ausente en resto de los especímenes analizados de la distribución geográfica de la especie. Esta autoapomorfía en la posición 607 se trata de una transición única detectada que podría indicar un patrón divergente de variación genética para esta población. Considerando el alelo variante en la peptidasa reportado por Hendrickson (1987), este sería el segundo polimorfismo genético detectado para la población del Río Sonoyta. Rach *et al.* (2008) indica que la suposición de que un atributo característico se ha fijado dentro de una población gana más confianza si se analiza un mayor número de muestras, Zhang *et al.* (2010), indica que el tamaño de muestra deseado para un análisis de códigos de barras de ADN debe oscilar entre 9.5 y 216.6. Sin embargo, dentro de la familia Cyprinidae, Ballesteros-Córdova *et al.* (2019) detectaron también sólo un polimorfismo en *Gila* cf. *eremica* del Arroyo el Tigre (Cañones la Balandrona y la Pirinola) en la Cuenca del Río Mátape. Esta variante genética fue determinada como una autoapomorfía en comparación con *G. eremica* y también con el congénere cercano *G. purpurea*. Rach *et al.* (2008) identificaron menos de tres caracteres diagnósticos en diez taxones hermanos relacionados muy cerrados del orden de insectos Odonata utilizando el gen mitocondrial *NDH1*, mostrando resultados similares a los obtenidos entre poblaciones de *G. cf. eremica* y *G. eremica*.

Estos caracteres diagnósticos resultado del análisis del código de barras basado en caracteres son sustentados por la filogenia mitocondrial y nuclear definiendo caracteres diagnósticos para todas las poblaciones de *A. chrysogaster*, ya que no se registraron clados geográficos en el análisis cladista efectuado. Para el caso de la población del Río Sonoyta, su carácter diagnóstico es sustentado por la filogenia de los genes mitocondriales y del concatenado, donde su autoapomorfía muestra un clado monofilético al interior de la variación del resto de las poblaciones de *A. chrysogaster*. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias morfológicas que se sean útiles para relacionar con estos datos moleculares, sólo Hendrickson (1987) observó un morfotipo intermedio entre el morfotipo norteño resultante para *A. chrysogaster* y el morfotipo sureño asignado a la nueva especie aún sin describir del género *Agosia* en su análisis morfométrico. El descubrir una variante genética como una nueva especie es insuficiente si no se utiliza un criterio adicional, tradicionalmente de tipo morfológico que se ajuste al sistema tradicional de corroboración taxonómica (DeSalle *et al.*, 2005; DeSalle, 2006; Ballesteros-Córdova *et al.*, 2016). Una fuente de datos única de carácter

molecular o morfológica o de cualquier otro tipo no debe utilizarse por sí sola para la propuesta en el descubrimiento de especies (Rach *et al.*, 2008). Tradicionalmente la comparación de secuencias de ADN se está utilizando para detectar variantes genéticas que después de una corroboración taxonómico integrado de enfoque morfológico utilizando un concepto de especie, pueden resultar en especies nuevas (Rubinoff, 2006; Rach *et al.*, 2008).

Las diferencias detectadas a nivel molecular y morfológico indican que la población del Río Sonoyta es la más divergente de las existentes en el Noroeste de Sonora para *A. chrysogaster*. Su condición de extremo riesgo de extirpación reciente obliga a acelerar las estrategias de recuperación de su última población remanente ubicada en el refugio del CEDO en Puerto Peñasco, Sonora. Minckley *et al.* (2013) documentan este evento de extirpación de sus poblaciones naturales del cauce del Río Sonoyta y los esfuerzos multiinstitucionales binacionales para la recuperación de los individuos remanentes y la construcción de refugios para su resguardo.

VI.3. Análisis de variabilidad genética para las poblaciones del linaje de *Agosia chrysogaster*

La distribución de frecuencias haplotípicas del gen mitocondrial *ND2* para las poblaciones del linaje de *A. chrysogaster* analizadas en nuestro estudio mostraron un total de 26 haplotipos, de los cuales las poblaciones del Río Magdalena y el Arroyo Agua Caliente compartieron tres haplotipos, mientras que el Río Santa Cruz sólo compartió uno con el Arroyo Agua Caliente. Por otro lado, los individuos de la cuenca del Río Sonoyta (Refugio del CEDO) solo tuvieron un haplotipo único para esa población.

El perfil de redes haplotípicas mostró las relaciones entre los diferentes haplotipos y determinó un posible haplotipo basal en la red del haplotipo 3 integrado por individuos de las dos poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción, lo que lo sugieren como el potencial haplotipo basal del linaje de *A. chrysogaster* de donde surgen el resto de los haplotipos obtenidos para la cuenca del Río de la Concepción. Por otra parte, el análisis reveló tres haplogrupos, uno de ellos integrado solo por los individuos de la cuenca del Río Sonoyta, otro por la cuenca del Río de la Concepción y Río Santa Cruz y el tercero integrado solo por

individuos del Río Santa Cruz (Figura 6). Sin embargo, a pesar de que la presencia de distintos haplogrupos ha sido considerada anteriormente como evidencia de aislamiento entre poblaciones (George *et al.*, 2008), esto puede indicar un posible intercambio genético entre individuos de la cuenca del Río Santa Cruz y Río de la Concepción en algún punto de su historia evolutiva.

Los análisis de diversidad de gen y nucleótido donde se evaluaron cuatro poblaciones en conjunto del linaje de *A. chrysogaster* mostraron valores muy similares al interior de las poblaciones de todas las cuencas. Los resultados adicionalmente indicaron valores distintos de diversidad de gen y nucleótido para las poblaciones de la cuenca del Río Sonoyta en contra de las poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción y el Río Santa Cruz.

Los AMOVA donde las poblaciones fueron consideradas como cuatro mostraron el mismo patrón de resultados al indicar que el mayor porcentaje de la variación se encuentra entre los grupos analizados. Los valores de F_{st} en el análisis pareado de todas las poblaciones del linaje *A. chrysogaster*, mostraron a las dos poblaciones de la cuenca del Río de la Concepción con un bajo valor de diferenciación genética (Tabla 10) lo que sugiere la presencia de flujo genético entre ellas. Estos resultados aunados al bajo número de migrantes por generación entre las cuatro poblaciones y los elevados índices de diferenciación genética entre cuencas sugieren que no existe flujo genético entre ellas e indican grupos genéticamente diferenciados. Los índices de diferenciación genética en el análisis pareado dentro de las poblaciones de las cuencas mostraron valores de $F_{st} = 0.61573$ con un número de migrantes por generación de $N_m < 1$. Dichos valores de F_{st} y N_m sugieren un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones y un alto nivel de diferenciación genética entre las diferentes cuencas hidrológicas.

VII. CONCLUSIONES

Toda la filogenia mitocondrial y nuclear de *Agosia chrysogaster* detectan la monofilia para todas las poblaciones en su distribución en Sonora.

No se evidenciaron clados geográficos para las poblaciones de la especie y el *Cytb* y su concatenado con *COX1* muestra a la población del Río Sonoyta como un clado independiente anidado al interior del resto de los individuos analizados.

El código de barras con el gen *COX1* mostró 18 caracteres puros individuales para discriminar a las poblaciones de *A. chrysogaster* en toda su distribución, de las especies de su género hermano *Algansea* y es congruente con la señal filogenética.

Se detectó un polimorfismo único fijo en los cinco ejemplares de la población del Río Sonoyta (refugio del CEDO) como evidencia de la divergencia de la población del Río Sonoyta.

Se detectó un haplotipo exclusivo para la población del Río Sonoyta (Refugio del CEDO) ya que no se compartió con ninguna otra de las cuencas.

Los análisis moleculares de varianza demostraron un alto porcentaje de variación entre las cuencas analizadas para el linaje de *A. chrysogaster*, lo que puede ser a causa de la alta diferenciación genética entre ellas.

Los índices de diferenciación genética y el número de migrantes por generación detectados entre cuencas hidrológicas del linaje de *A. chrysogaster* sugieren diferenciación genética entre ellas debido a un restringido flujo de genes por lo que deben considerarse un manejo independiente para cada una ellas.

VIII. RECOMENDACIONES

Desarrollar investigaciones más amplias sobre la especie utilizando marcadores nucleares para las poblaciones de *A. chrysogaster* en toda su distribución para corroborar sus relaciones evolutivas y variabilidad genética.

Analizar la morfología de *A. chrysogaster* de la cuenca del Río Sonoyta en comparación con el resto de su distribución en Sonora y el suroeste de los Estados Unidos por medio de técnicas morfométricas novedosas.

Monitoreo de las abundancias poblacionales y de las condiciones de los hábitats de ocupación de la especie a lo largo de toda su distribución.

Proponer un estatus de conservación de la especie de acuerdo con el 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 del Río Sonoyta.

Reinventariar la fauna de peces dulceacuícolas en el Noroeste de México con énfasis en las poblaciones de *A. chrysogaster* y evaluar con precisión el estado de conservación de la diversidad de peces nativos del Noroeste de México.

IX. LITERATURA CITADA

- 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.
- 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.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers natural history and evolution*. Chapman-Hall. New York, USA. 511.
- Baker, M. L., J. P. Wares, G. A. Harrison y R. D. Miller. 2004. Relationships among the families and orders of marsupials and the major mammalian lineages based on recombination activating gene1. *Journal of Mammalian Evolution* 11:1-16.
- Ballesteros-Córdova, C. A., G. Ruiz-Campos, L. T. Findley, J. M. Grijalva-Chon, L. E. Gutiérrez-Millán, A. Varela-Romero. 2016. Morphometric and meristic characterization of the endemic Desert chub *Gila eremica* (Cyprinidae, Teleostei), and its related congeners in Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 390-398.
- Ballesteros-Córdova, C. A., A. Varela-Romero, G. Ruiz-Campos, L. T. Findley, J. Grijalva-Chon y L. E. Gutiérrez-Millán. 2019. Mitochondrial evidence for a new evolutionary significant unit within the *Gila eremica* lineage (Teleostei, Cyprinidae) in Sonora, Northwest Mexico. *Animal Biodiversity and Conservation*, 42: 171-186.
- 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*
- Broughton, R. E., y J. R. Gold. 2000. Phylogenetic relationships in the North American cyprinid genus *Cyprinella* (Actinopterygii: Cyprinidae) based on sequences of the mitochondrial ND2 and ND4L genes. *Copeia* 2000, 1-10.
- Bufalino, A. P., y R. L. Mayden. 2010. Molecular phylogenetics of North American phoxinins (Actinopterygii: Leuciscidae) based on RAG1 and S7 nuclear DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 274-283.
- Calmus, T., R. V. Granillo y R. L. Zazueta. 2011. Evolución geológica de Sonora durante el Cretácico Tardío y el Cenozoico. *Boletín del Instituto de Geología de la UNAM*, 118, 227-266.
- Cashner, M. F. y H. L. Bart Jr. 2010. Reproductive ecology of nest associates: use of RFLPs to identify cyprinid eggs. *Copeia*, 2010, 554-557.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An Integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47-50.
- 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.
- Hardman, M., 2002. The phylogenetic relationships among extant catfishes, with special reference to Ictaluridae (Otophysi: Siluriformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign. Urbana, Illinois.
- Hardman, M. 2004. The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombination activating gene 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 395-408.
- 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. 1988. *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.
- Heindl, L. A. 1963. *Cenozoic Geology in the Mammoth Area Pinal County, Arizona*. US Government Printing Office.
- 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. 1987. Geographic variation in morphology of *Agosia chrysogaster*, a Sonoran Desert cyprinid fish. Ph. D. Dissertation, Arizona State University, Tempe Arizona.
- Huckleberry, G. 1996. Historical channel changes on the San Pedro River, southeastern Arizona.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- López, J.A., W.J. Chen y G. Ortí. 2004. Esociform phylogeny. *Copeia* 2004, 449–464
- Lynch, D. J. 1981. Trachytes and Alkali Basalts of Pinacate Volcanic Fields of Northwest Sonora, Mexico, their Ages, Composition, and Morphologies. *Geological Society of America* 19: 1-113.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>.
- Menges, C. M. 1981. The Sonoita Creek Basin: Implications for late Cenozoic Tectonic evolution of basins and ranges in southeastern Arizona.
- Miller, R. R., W. L. Minckley, S. M. Norris y J. J. Schmitter-Soto. 2009. Peces dulceacuícolas de México. CONABIO, SIMAC, ECOSUR y DFC.
- Minckley, C., I. I. Pompa, D. Duncan, R. Timmons, D. Caldwell, J. L. Méndez y P. Rosen. 2013. Native Aquatic Vertebrates: Conservation and Management in the Río Sonoyta Basin, Sonora, Mexico. U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.

- Minckley, W. L. y P. C. Marsh. 2009. Inland Fishes of the Greater Southwest: Chronicle of a Vanishing Biota. University of Arizona Press, Tucson.
- NatureServe, Lyons, T.J., Espinosa Pérez, H. y Lambarri Martínez, C. 2019. *Agosia chrysogaster*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T191246A129628655. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T191246A129628655.en>
- Nelson, J. S. 1994. Fishes of the World. John Wiley and Sons, New York. 600.
- Packer, L., J. Gibbs, C. Sheffield y R. Hanner. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources* 9: 42-50.
- Pérez-Rodríguez, R., O. Domínguez-Domínguez, G. P. P. de León e I. Doadrio. 2009. Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Algansea* Girard (Cypriniformes: Cyprinidae) of central Mexico inferred from molecular data. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 223.
- 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.
- 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.
- Rambaut, A. 2014. FigTree v1.4.2: Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk>.
- Rubínoff, D., S. Cameron., K. Will. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for barcoding identification. *Journal of Heredity* 97: 581-594.
- 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.
- 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 León.
- Schönhuth, S., I. Doadrio, O. Domínguez-Domínguez D. M. Hillis y R. L. Mayden. 2008. Molecular evolution of southern North American Cyprinidae (Actinopterygii), with the

- description of the new genus *Tampichthys* from central Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47 (2008) 729–756.
- 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.
- 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.
- Shedko, S. V., I. L. Miroshnichenko y G. A. Nemkova. 2012. Phylogeny of salmonids (Salmoniformes: Salmonidae) and its molecular dating: Analysis of nuclear RAG1 gene. *Russian Journal of Genetics* 48: 575-579.
- Steinke, D., T. S. Zemlak, J. A. Boutillier y P. D. Hebert. 2009. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Marine Biology* 156: 2641-2647.
- Sullivan, J.P., S. Lavoué y C.D.Hopkins. 2000. Molecular systematics of the African electric Wshes (Mormyroidea: Teleostei) and a model for the evolution of their electric organs. *Journal of Experimental Biology* 203: 665–683.
- Sullivan, J.P., J.G. Lundberg, y M. Hardman. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41(3): 636–662. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.044>
- Swofford, D. L., 2002. PAUP* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 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.
- Tibbets, C. A. 1983. Patterns of genetic variation in three species of minnows native to the southwest United States. Master's Science, Arizona State University, Tempe, Arizona.
- Tibbets, C. A. 1998. Evolutionary genetics of *Agosia chrysogaster*. Ph. D. dissertation, Thesis Arizona State University, Tempe, Arizona.
- Tibbets C. A. y T.E. Dowling. 1996. Effects of intrinsic and extrinsic factors on populations fragmentation in three species of North American minnows (Teleostei: Cyprinidae). *Evolution* 50(3):1280-1292.
- Tokunaga, Y., M. Shirouzu, R. Sugahara, Y. Yoshiura, I. Kiryu, M. Ototake y M. Nakao. 2017. Comprehensive validation of T-and B-cell deficiency in rag1-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts. *Scientific Reports* 7: 1-10
- Troia, M. J., J. E. Whitney, y K. B. Gido. 2015. Thermal performance of larval longfin dace (*Agosia chrysogaster*), with implications for climate change. *Environmental Biology of Fishes* 98: 395-404.

- Trujillo, J. D., T. J. Pilger, M. R. Douglas, M. E. Douglas y T. F. Turner. 2012. Microsatellite markers for Longfin Dace, *Agosia chrysogaster*, a sentinel fish species in imperiled arid-land rivers of the Sonoran Desert. *Conservation Genetics Resources* 4: 927-929.
- Van-der-Meijden, A., M. Vences, y A. Meyer. 2004. Novel phylogenetic relationships of the enigmatic brevicipitine and scaphiophrynine toads as revealed by sequences from the nuclear Rag-1 gene. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 271: S378–S381.
- 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.
- Ward, R. D. 2012. FISH-BOL, a case study for DNA barcodes. *Methods in Molecular Biology* 858: 423-439.
- Witt, J. D., D. L. Threlloff 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.
- 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.
- Yi, S., J. Zhong, S. Huang, S. Wang y W. Wang. 2017. Morphological comparison and DNA barcoding of four closely related species in the genera *Misgurnus* and *Paramisgurnus* (Cypriniformes: Cobitidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 70: 50-59.
- 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.