

Research Article

Variación genética de *Procambarus llamas* (Decapoda: Cambaridae) en la península de Yucatán: evidencia de conectividad en un paisaje fragmentado

Eduardo Torres¹, Fernando Alvarez¹ & Alejandro Botello¹

¹Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-153, México 04510, D.F., México

RESUMEN. Dentro de la familia Cambaridae el género *Procambarus* es especialmente importante debido al número de especies que contiene y a su amplia distribución en el continente americano. *Procambarus (Austrocambarus) llamas* es una especie endémica de la península de Yucatán, distribuyéndose en cuerpos de agua epicontinentales, incluyendo lagos, pantanos y planicies de inundación, que pueden estar relativamente aislados. Debido a la naturaleza fragmentada de su hábitat se esperaba encontrar poblaciones muy estructuradas con haplotipos únicos. Para describir la variación genética de las diferentes poblaciones de *P. llamas* y su patrón de distribución se realizó un análisis filogeográfico usando el gen mitocondrial COI. Se secuenció un fragmento de 643 pares de bases de 53 organismos en diez poblaciones. Se identificaron los diferentes haplotipos y se construyó una red usando parsimonia estadística para realizar un análisis de clados anidados. Se encontró un total de 14 sitios variables, de los cuales 12 fueron informativos; todos los cambios nucleotídicos fueron transiciones y la diversidad nucleotídica fue de $\pi = 0,0045$. Se encontraron 10 haplotipos con una diversidad haplotípica de $HD = 0,532$, con uno de ellos ampliamente distribuido. El análisis de clados anidados muestra que los haplotipos actuales son el resultado de una expansión contigua del intervalo de distribución, sugiriendo que el origen de la expansión se ubicó en el sector sur de la península. Esto puede ocurrir debido a las inundaciones estacionales en la región, que pueden crear conexiones temporales entre poblaciones.

Palabras clave: *Procambarus llamas*, variación poblacional, COI, dispersión, península de Yucatán, México.

Genetic variation in *Procambarus llamas* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) from the Yucatan Peninsula: evidence of connectivity in a fragmented landscape

ABSTRACT. Within the family Cambaridae, the genus *Procambarus* is especially important due to the number of species it contains and its wide distribution in the American Continent. *Procambarus (Austrocambarus) llamas* is endemic to the Yucatan Peninsula, distributed in epicontinental water bodies, including lakes, marshes and flood plains, which may be relatively isolated. Due to the fragmented nature of its habitat, it might be expected to find highly structured populations with unique haplotypes. To describe the genetic variation of the different populations of *P. llamas* and their distribution pattern, a phylogeographic analysis was performed using the mitochondrial COI gene. A 643 base pair fragment was sequenced from 53 individuals of ten populations. Different haplotypes were identified and a haplotype network was built using statistical parsimony for nested clade analysis. A total of 14 variable sites were found, 12 of which were informative; all nucleotide changes were transitions and nucleotide diversity was $\pi = 0.0045$. Ten haplotypes were found with a diversity of $HD = 0.532$, with one of them widely distributed. The nested clade analysis shows that current haplotypes are the result of a contiguous range expansion, suggesting that the source of the expansion was at the southern portion of the peninsula. This may occur due to the seasonal floodings in the region, which can create temporary connections between populations.

Keywords: *Procambarus llamas*, population change, COI, dispersal, Yucatan Peninsula, Mexico.

INTRODUCCIÓN

Procambarus (Austrocambarus) llamas Villalobos, 1954, es una especie endémica de la península de Yucatán que habita ríos, lagos, zonas de inundación estacional, pantanos costeros, arroyos, canales en campos agrícolas, cenotes, aguadas y marismas en gran parte de la península (Rodríguez, 1999). Algunas de las características de *P. (A.) llamas* es que son omnívoros, su alimentación preferente en el estado juvenil es de insectos, moluscos y peces, en su fase adulta prefieren la materia en descomposición, raíces y organismos muertos. Presentan un ciclo de vida corto y directo, su edad máxima observada es de dos años y comienzan a reproducirse a partir de los 40 mm de longitud total (Rodríguez, 1999). La característica morfológica más prominente de *P. llamas* es que los dedos de los quelípedos están cubiertos con cerdas (Villalobos, 1954).

Considerando que *P. llamas* habita en diferentes tipos de cuerpos de agua que no están conectados, ocupando la mayor parte de la península de Yucatán, se planteó un estudio para efectuar comparaciones entre poblaciones. Debido a la variedad de hábitats y a la extensión de la distribución de *P. llamas*, se esperaba encontrar una estructura genética evidente (Fig. 1). Se utilizó un fragmento del gen mitocondrial COI para examinar la relación entre la variación genética y la distribución geográfica de cada población, para investigar si existen especies crípticas o niveles bajos de diferenciación, así como para explorar los posibles mecanismos que expliquen ese patrón y la distribución actual (Buhay & Crandall, 2008; Torres & Alvarez, 2012).

Un estudio previo sobre la variación genética del camarón palaemónido *Creaseria morleyi* (Creaser, 1936), endémico de la península de Yucatán, pero habitante de aguas subterráneas, mostró que la falta de diferenciación genética entre poblaciones aisladas puede explicarse por medio de la ocurrencia de cuellos de botella periódicos debidos a los cambios en el nivel del mar (Botello & Alvarez, 2010). La hidrología de la península de Yucatán, al ser una placa calcárea plana y sin relieve, ha sido afectada directamente por los cambios en el nivel del mar durante el último millón de años, reduciéndose y expandiéndose periódicamente las áreas habitables por organismos dulcea-cuícolas (Wilkins, 1982; Beddows, 2003).

Ya que *P. llamas* presenta un patrón de distribución fragmentado en diferentes regiones y habita en ambientes contrastantes de la península de Yucatán, se esperaba encontrar poblaciones genéticamente estructuradas con haplotipos propios de cada población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

Las colectas se realizaron en diez poblaciones de *P. llamas* en la península de Yucatán, cubriendo los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Tabla 1). Se recolectaron 53 organismos que se identificaron mediante Hobbs (1972) y Villalobos (1955). Los organismos se preservaron en alcohol al 96% (Dessauer *et al.*, 1996) y se depositaron en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR) del Instituto de Biología, UNAM. Los siguientes caracteres morfológicos fueron examinados en todos los ejemplares: caparazón, rostro, dedos de la quela mayor cubiertos con cerdas, primer par de pleópodos del macho forma I y *annulus ventralis* de la hembra.

Trabajo de laboratorio

Se realizaron disecciones en el abdomen para obtener tejido muscular. Se siguió el protocolo de extracción fenol-cloroformo para la obtención de ADN total, cuyo último paso es suspenderlo en 100 µL de agua bidestilada y almacenar a -20°C (Hillis *et al.*, 1996). Posteriormente, se amplificó mediante PCR (Saiki *et al.*, 1988) un fragmento del gen COI mitocondrial utilizando los oligonucleótidos LCO1490 (5'-GGTCA ACAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). La PCR se realizó en un Bio Rad MJ Mini Personal Thermal Cycler, con un volumen final de 25 µL que contenían 1,5 µL de cada oligonucleótido, 2,5 µL de buffer, 2,5 µL de dNTP's, 1,25 µL de MgCl₂, 0,125 µL de Taq polimerasa y 1 µL de ADN, lo restante fue de ddH₂O. Las condiciones del termociclador fueron: 94°C por 1 min, seguidas de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 48°C por 30 s y extensión a 72°C por 1,5 min, seguida de una extensión final a 72°C por 1,5 min. Los productos de la PCR se purificaron con columnas MontageTM PCR (Millipore, Bedford USA), resuspendiendo en 20 µL de ddH₂O. El paso siguiente fue la secuenciación cíclica en ambas direcciones (Hillis *et al.*, 1996) utilizando el kit BigDye Terminator y los mismos oligonucleótidos. Para recobrar el ADN se utilizó Sephadex y las columnas Centri Sep Spin Columns (Princeton Separations, Adelphia N.J.). Los productos fueron procesados en un secuenciador automático 3100 Genetic Analyzer ABI Prism.

Análisis de datos

Las secuencias se visualizaron y corrigieron con el programa Chromas 2 y se alinearon manualmente con

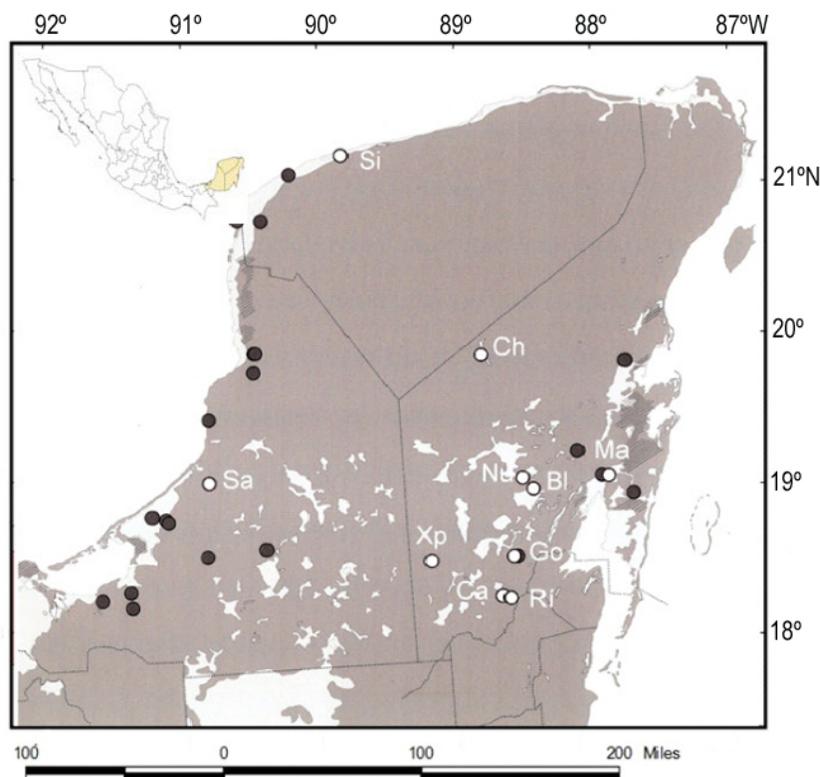


Figura 1. Distribución de *Procambarus (A.) llamas* en la península de Yucatán de acuerdo a los registros de ejemplares depositados en la Colección Nacional de Crustáceos (●) y puntos de colecta (○). Sabancuy (Sa), Blanca Flor (Bl), Cacao (Ca), Chichankaanab (Ch), González Ortega (Go), Mahahual (Ma), Nueva Jerusalém (Nu), Río Hondo (Ri), Xpujil (Xp) y Sisal (Si).

Tabla 1. Ubicación de las localidades muestreadas de *Procambarus (A.) llamas* en la península de Yucatán, abreviación en los mapas y número de organismos para el análisis.

Estado	Localidad	Latitud (N)	Longitud (W)	No.	Catálogo CNCR
Campeche	Sabancuy	18°53'21,9"	91°02'21,9"	7	24892, 24889, 24893
	Blanca Flor	18°54'43,0"	88°28'39,5"	3	24897
	Cacao	18°12'03,3"	88°45'17,0"	5	24896
	Chichankaanab	19°49'12,0"	88°46'48,0"	7	24883
Quintana Roo	González Ortega	18°29'15,1"	88°38'25,8"	6	24900
	Mahahual	18°58'17,9"	87°57'25,9"	5	24902
	Nueva Jerusalém	18°59'20,5"	88°33'33,6"	3	24898
	Río Hondo	18°11'12,3"	88°41'40,4"	9	24903
	Xpujil	18°29'22,3"	89°15'46,1"	5	24885
Yucatán	Sisal	21°10'17,9"	89°59'50,5"	3	24895

el programa BioEdit 7 (Hall, 1999). Al tener todas las secuencias alineadas, se calculó la frecuencia de nucleótidos con el programa PAUP (Swofford, 2002) y la diversidad nucleotídica “ π ” con el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) la cual permite determinar el grado de variación entre las diferentes secuencias (Avise, 1999). Con el programa jModelTest

(Posada & Crandall, 1998) se obtuvo el modelo nucleotídico que mejor se ajuste a las secuencias. Se calculó la distancia P y chi cuadrado (χ^2) para saber si existen diferencias significativas entre las secuencias con el programa PAUP (Swofford, 2002). Con este mismo programa se elaboró un dendrograma de distancia sin corregir con el método de agrupamiento

del vecino más cercano (NJ) y el modelo sugerido por el programa jModelTest (Posada & Crandall, 1998). Para probar el soporte de las ramas se efectuó el remuestreo de los caracteres con el método de “bootstrap” con 1.000 réplicas. Como grupo externo se utilizaron dos secuencias de *Procambarus* (*A. mirandai*) colectados en San Antonio Tzujulá y Las Rosas, Chiapas, con número de acceso de GenBank: JQ973662. Se identificaron los diferentes haplotipos y se obtuvo su diversidad “HD” con el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009).

Para probar la posible estructura jerárquica entre las poblaciones se realizó un AMOVA con el programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). Se elaboró un análisis de clados anidados (NCA; Templeton *et al.*, 1995) donde, como primer paso, se obtuvo una red de haplotipos utilizando el método de parsimonia estadística con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), para saber el grado de relación entre las poblaciones. La red de haplotipos se utiliza como base para definir una serie jerárquica de clados anidados. El anidamiento se elaboró manualmente, de acuerdo a los criterios propuestos por Templeton *et al.* (1995). Para realizar el análisis cladístico anidado se utilizó el programa GEODIS 2.6 (Posada *et al.*, 2000), donde se introducen las coordenadas geográficas de las poblaciones. En los clados anidados se calculan dos distancias: la distancia al clado (D_c), que mide la dispersión geográfica de cada uno de los clados, y la distancia al clado anidado (D_n), que mide cómo está distribuido geográficamente el clado con relación a otros clados en el mismo nivel de categoría anidada (Hernández *et al.*, 2007). Las distancias y sus valores de significancia fueron revisados en los diferentes clados y se buscaron los patrones de distribución entre haplotipos como fragmentación, expansión de la distribución, aislamiento por distancia u otros, empleando la clave de inferencia revisada por Posada & Templeton (2011). Para calcular el tiempo de divergencia de las secuencias se utilizaron dos tasas de mutación del COI, la que presentan especies hermanas de camarones chasqueadores del istmo de Panamá *Alpheus* spp. de 1,2% por millón de años (Knowlton *et al.*, 1993), y la que presentan los grápsidos del género *Sesarma* en la isla de Jamaica, de 2,3% por millón de años (Schubart *et al.*, 1998).

RESULTADOS

Se analizaron 53 secuencias de 10 poblaciones. La longitud de la región amplificada fue de 643 pb. Con el fin de saber en que posición se encuentra este fragmento en el gen COI, se alineó con el gen completo (1534 pb) de la jaiba *Callinectes sapidus*

(GenBank número de acceso AY682075) y corresponde al intervalo entre los sitios 40 y 682. La frecuencia de nucleótidos en el alineamiento fue de A = 0,26; C = 0,1369; G = 0,2035; T = 0,3996, no existiendo diferencias significativas entre los nucleótidos de las secuencias ($\chi^2 = 0,295$, gl = 156, $P = 1$). La diversidad nucleotídica total de la especie con este gen fue de $\pi = 0,0045$ (Tabla 2). Las secuencias muestran 14 sitios variables de los cuales 12 son informativos. Las distancias genéticas sin corregir entre secuencias van de $P = 0$ a 0,01711, lo que equivale de 0 a 11 sitios variables. Todos los cambios encontrados entre las bases son transiciones en la tercera posición del codón. Existen 10 haplotipos (Tabla 3) con una diversidad total de HD = 0,532 (Tabla 2). Con respecto a la diversidad nucleotídica y a la diversidad de haplotipos por población, se puede observar que Cacao, Río Hondo y Sabancuy son las únicas localidades que presentan π y HD diferente de cero (Tabla 2).

La distribución de haplotipos en la península de Yucatán muestra que el haplotipo C es el más ampliamente distribuido (Fig. 2). Los haplotipos D, E, F y G se encuentran en una sola localidad, Río Hondo; Sisal muestra un haplotipo exclusivo J, mientras que en la localidad de Sabancuy se presentan los haplotipos H, I y C.

El análisis de distancia NJ se realizó utilizando el modelo sugerido por el programa jModelTest (Posada & Crandall, 1998): HKY, el dendrograma muestra la existencia de dos grupos: el primero formado por los haplotipos encontrados en Río Hondo y el segundo por las restantes nueve localidades con muy baja variación en Sabancuy, Sisal y Cacao (Fig. 3).

Con los dos grupos sugeridos antes, se corrió el AMOVA cuyos resultados muestran que la mayor proporción de la varianza se explica por la diferencia entre los grupos propuestos (94,3%), además de ser significativa ($P < 0,005$). En contraste, en los otros niveles jerárquicos la diferencia entre las poblaciones dentro de los grupos y dentro de las poblaciones, aportaron un bajo valor de la explicación de la varianza (1,67 y 3,99% respectivamente). De este análisis también se obtuvo una red de expansión mínima (MSN por sus siglas en inglés) cuya estructura y relación entre grupos es igual a la obtenida con el análisis de NJ y el programa TCS.

En la red de haplotipos, el haplotipo C, que fue el más distribuido, mostró una variación de una transición con los haplotipos A (Cacao), B (Cacao), H (Sabancuy) y J (Sisal); dos transiciones con el haplotipo I (Sabancuy); y una distancia genética más grande con respecto a los haplotipos D, E, F y G de Río Hondo, que se separan por siete sustituciones

Tabla 2. Diversidad nucleotídica (π) y diversidad de haplotipos (HD) por población y total.

Población	π	HD
Sabancuy	0,00118	0,524
Blanca Flor	0	0
Cacao	0,00156	0,800
Chichankanab	0	0
González Ortega	0	0
Mahahual	0	0
Nueva Jerusalém	0	0
Río Hondo	0,00130	0,694
Xpujil	0	0
Sisal	0	0
Total	0,00445	0,532

hipotéticas (Fig. 4). El anidamiento de los clados en la red de haplotipos, resultó en tres clados de primer nivel, dos de segundo y el clado general (Fig. 5). El análisis de clados anidados del clado 1-2, que incluye al haplotipo más distribuido, y que podría ser el ancestral, se interpreta como una expansión del área de distribución contigua, de acuerdo a la tabla de inferencia disponible en http://darwin.uvigo.es/download/geodisKey_06Jan11.pdf (Tabla 4; Posada & Templeton, 2011). Los clados 2-2 y 3-1 dieron resultados no concluyentes pues sus D_c y D_n no son significativas, el resto de los clados se excluyen del análisis ya que sus haplotipos no presentan variación geográfica.

Los tiempos de divergencia entre los haplotipos C y J fueron de 65.000 a 125.000 años. Se tomaron estos dos haplotipos porque C es el más distribuido y J es exclusivo de la población geográficamente más distante, Sisal, mientras que A y B sólo están en Cacao y H e I sólo están en Sabancuy, ambas poblaciones también presentan el haplotipo C (Fig. 5). El tiempo de divergencia promedio entre el nodo de los haplotipos de Río Hondo y el resto de los haplotipos fue de 637.700 a 1,200.000 años.

DISCUSIÓN

Variación genética y tiempo de divergencia

El análisis muestra que sólo en tres de las diez poblaciones estudiadas existe un cierto grado de diferenciación genética, siendo éstas Cacao, Sabancuy y Río Hondo, con valores de HD entre 0,52 y 0,8. *Procambarus llamasí* mostró valores bajos de divergencia genética entre secuencias, que van de 0,15 a 1,71%. Torres & Álvarez (2012) reportaron valores similares para las poblaciones nativas e introducidas

de *Procambarus clarkii*, en México y Costa Rica, con una divergencia entre las secuencias del gen COI que va de 0 a 2%. Fetzner & Crandall (2003), encontraron para el acocil *Orconectes luteus* valores más altos, que fluctuaron entre 0,002 y 4,2%. De manera que los valores encontrados para *P. llamasí* se encuentran dentro del intervalo de variación que pueden mostrar las poblaciones de una misma especie.

Los tiempos de divergencia que se estimaron para los haplotipos C y J de *P. llamasí*, divergieron hace relativamente poco, entre 125.000 y 65.000 años, ambos tiempos estimados con el mismo marcador genético. El tiempo de divergencia entre estos dos haplotipos coincide con un periodo de cambios constantes en el nivel del mar ya que hace 125.000 años el nivel del mar era 7 m más y hace 18.000 de 100 m menos con respecto al nivel actual (Beddows, 2003). Estas fluctuaciones debieron ocasionar grandes cambios en el acuífero de la península de Yucatán que, en el caso de la disminución del nivel mar, debió haber perdido la mayoría de los cuerpos de agua superficiales como lo describe Covich & Stuiver (1974). En este escenario, las poblaciones de *P. llamasí* debieron haberse contraído a refugios en los que el tamaño poblacional y la variación genética disminuyeron generando cuellos de botella. La expansión posterior, una vez que se recuperaba el nivel del mar, el acuífero y los cuerpos de agua superficiales de la península de Yucatán, explicaría la baja variación encontrada entre poblaciones geográficamente distantes.

El tiempo de divergencia entre los haplotipos de *P. llamasí* de Río Hondo y los del resto de la península indica que se separaron durante el Pleistoceno, tiempo en el cual estaban emergiendo la parte norte y periferia de la península y, a su vez, sucedían las grandes glaciaciones. A pesar de la divergencia entre estos haplotipos no existen diferencias morfológicas en el caparazón, rostro, dedos de la quela mayor cubiertos con cerdas, primer par de pleópodos del macho forma I y *annulus ventralis*, que sugieran que la población de Río Hondo representa una especie diferente.

Análisis de clados anidados

Los bajos niveles de diferenciación genética entre poblaciones de *P. llamasí* distantes geográficamente podría deberse a procesos de aislamiento que han ocurrido recientemente. Buhay & Crandall (2005), mencionan que una expansión de rango contiguo seguido de periodos de aislamiento es el principal mecanismo que provoca una variación genética baja, aunque mayor de lo que ellos esperaban para las especies de acociles de cavernas, siendo esta $\pi =$

Tabla 3. Secuencias y haplotipos del gen mitocondrial COI, por población de *Procambarus (A.) llamasii*. Los nucleótidos marcados en oscuro corresponden a las bases que difieren del haplotipo más distribuido (haplotipo C). Los números entre paréntesis indican los individuos que presentan el mismo haplotipo.

Población y ejemplares	Haplotipo	Sitio														Número GenBank
		101	104	185	213	266	302	332	344	404	413	509	536	542	632	
Cacao	C (2)	C	T	A	T	A	G	G	T	A	G	T	A	G	C	JN000909
	A	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	JQ913002
	B (2)	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	JQ913003
Mahahual	C (5)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Río Hondo	D	T	C	•	•	•	•	A	•	•	A	C	G	A	T	JQ913004
	E (2)	T	•	•	•	G	•	A	•	•	A	C	G	A	T	JQ913005
	F	T	C	G	•	G	•	A	•	•	A	C	G	A	T	JQ913006
	G (5)	T	C	•	•	G	•	A	•	•	A	C	G	A	T	JQ913007
Sabancuy	C (5)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	H	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	•	•	•	JQ913008
	I	T	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	•	•	•	JQ913009
Blanca Flor	C (3)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
González Ortega	C (6)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Nueva Jerusalém	C (3)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Xpujil	C (5)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Sisal	J (3)	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	JQ913010
Chichankanab	C (7)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	

0,0023 a 0,0089 en el gen COI mitocondrial. A pesar de la creencia sobre el estado en riesgo de las especies estigobíticas, sus resultados muestran que las especies de acociles subterráneos han alcanzado niveles de diversidad genética que va de moderada a alta, con tamaños poblacionales más altos de lo esperado, además el análisis de clados anidados muestra un extenso flujo génico dentro del sistema cárstico.

Para explicar el resultado del clado 1-1, donde se propone una expansión contigua de la distribución entre estas poblaciones, se considera que algunas zonas de la península de Yucatán se han encontrado bajo la influencia de inundaciones estacionales que, por temporadas, comunican cuerpos de agua que se encuentran adyacentes. Buhay & Crandall (2005) reportan que los acociles estigobíticos son severamente limitados en sus habilidades para dispersarse a través de barreras superficiales y subterráneas, excepto cuando los niveles de agua son altos y los acociles pueden migrar fuera de sus cavernas y recorrer distancias cortas, lo que ocasiona una expansión del rango por zonas contiguas.

Otros organismos acuáticos de la península de Yucatán presentan patrones similares respecto a la distribución de sus haplotipos, como el que presenta *P. llamasii* donde las poblaciones se reducen cuando el nivel del mar ha descendido ocasionando cuellos de botella. Al subir nuevamente el nivel del mar, y

crearse más hábitats disponibles, se realiza una recolonización que expande el área de distribución de las especies. Como consecuencia de este proceso se tendría que la variabilidad genética se reduce en el cuello de botella y después los haplotipos sobrevivientes se distribuyen ampliamente durante la recolonización. Por ejemplo, el análisis de la región control del ADN mitocondrial en el pez *Poecilia orri* (Fowler, 1943), colectado en tres humedales y tres cenotes de la zona central de la Reserva de la Biósfera de Sian Ka'an, presenta aislamiento por distancia (Rojas, 2008); mientras que el camarón palaemónido estigobítico *Creaseria morleyi* colectado en 14 cenotes al norte de la península presenta un flujo génico restringido con aislamiento por distancia, análisis hecho con una región del gen COI mitocondrial (Botello, 2008; Botello & Alvarez, 2010). En cada uno de estos estudios se muestra una zona a partir de la cual el haplotipo propuesto como ancestral comienza a diversificarse. Se ha sugerido que para *Creaseria morleyi* la región de origen se ubica en la parte noreste de la península, mientras que para el pez *Poecilia orri* se ubica en la zona centroeste. Para *P. llamasii* pudo haber sido el sur de la península de Yucatán la zona a partir de la cual ocurrió la última diversificación, ahí se distribuye ampliamente un haplotipo que podría considerarse como ancestral y el número de cuerpos de agua superficiales es mayor que en el norte de la península.

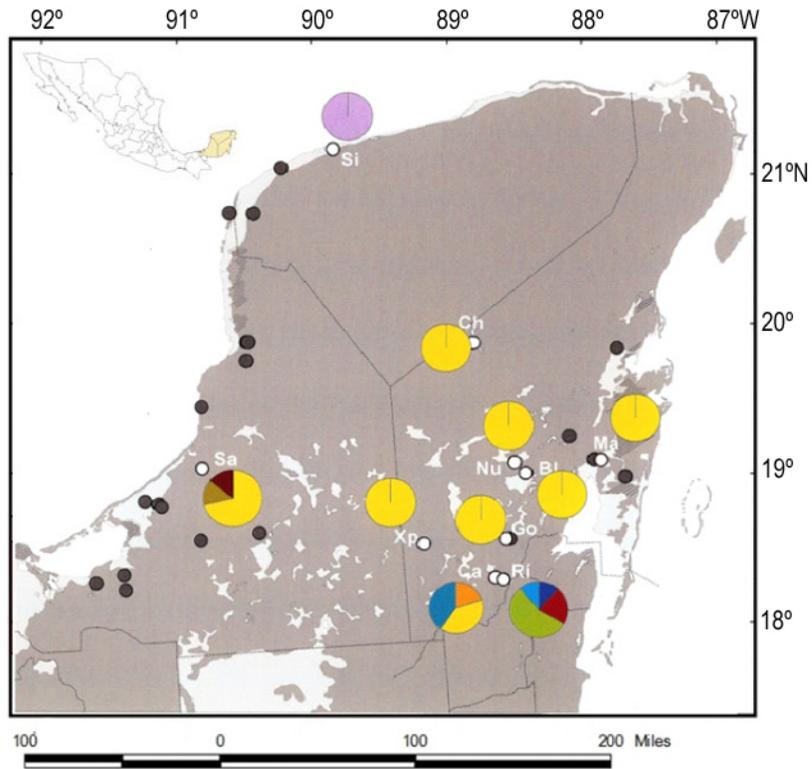


Figura 2. Mapa de las localidades de *Procambarus (A.) llamas* con la frecuencia de los haplotipos del gen COI propios de cada población en la península de Yucatán. Sabancuy (Sa), Blanca Flor (Bl), Cacao (Ca), Chichankaanab (Ch), González Ortega (Go), Mahahual (Ma), Nueva Jerusalém (Nu), Río Hondo (Rí), Xpujil (Xp) y Sisal (Si).

Tabla 4. Tabla de contingencia del análisis de relación geográfica de la red de haplotipos e interpretación de resultados según la clave de Posada & Templeton (2011).

Clados	Chi-cuadrado	P	Cadena de inferencias
1-2	65,800	0,000	1-2-11-12 Expansión del área de distribución contigua
2-2	11,074	0,108	1-2-11-17 Resultado no concluyente
3-1	53,000	0,000	1-2-11-17 Resultado no concluyente

¿Constituye *Procambarus (A.) llamas* un complejo de especies?

La baja variación genética encontrada entre las localidades muestreadas sugiere que *P. llamas* es una sola especie ampliamente distribuida en la península de Yucatán. Una revisión morfológica de caracteres diagnósticos como: caparazón con dos espinas laterales y normalmente tres espinas branquiostegales en cada lado, rostro ancho en su base con espinas laterales y una espina acuminal larga y puntiaguda, el primer par de pleópodos en el macho forma I con el proceso mesial aplanado en sentido cefalocaudal, entre otras, indica también que no existen diferencias que pudieran sustentar la idea de que se trate de un

complejo de especies. Lo que sí existe es un cierto grado de adaptación fisiológica local, ya que las diferentes poblaciones de *P. llamas* pueden adaptarse a condiciones particulares de salinidad (Muñoz, 2009) y pueden mostrar variaciones en algunas relaciones alométricas.

Resulta interesante que los organismos de Río Hondo muestren una alta diferenciación genética con respecto a las demás poblaciones estudiadas, de las que no difieren morfológicamente. La falla de Río Hondo podría estar ocasionando la variación genética encontrada, ya que podría ser una barrera física que impide el flujo genético entre ellas. Esta falla provoca condiciones contrastantes entre poblaciones muy

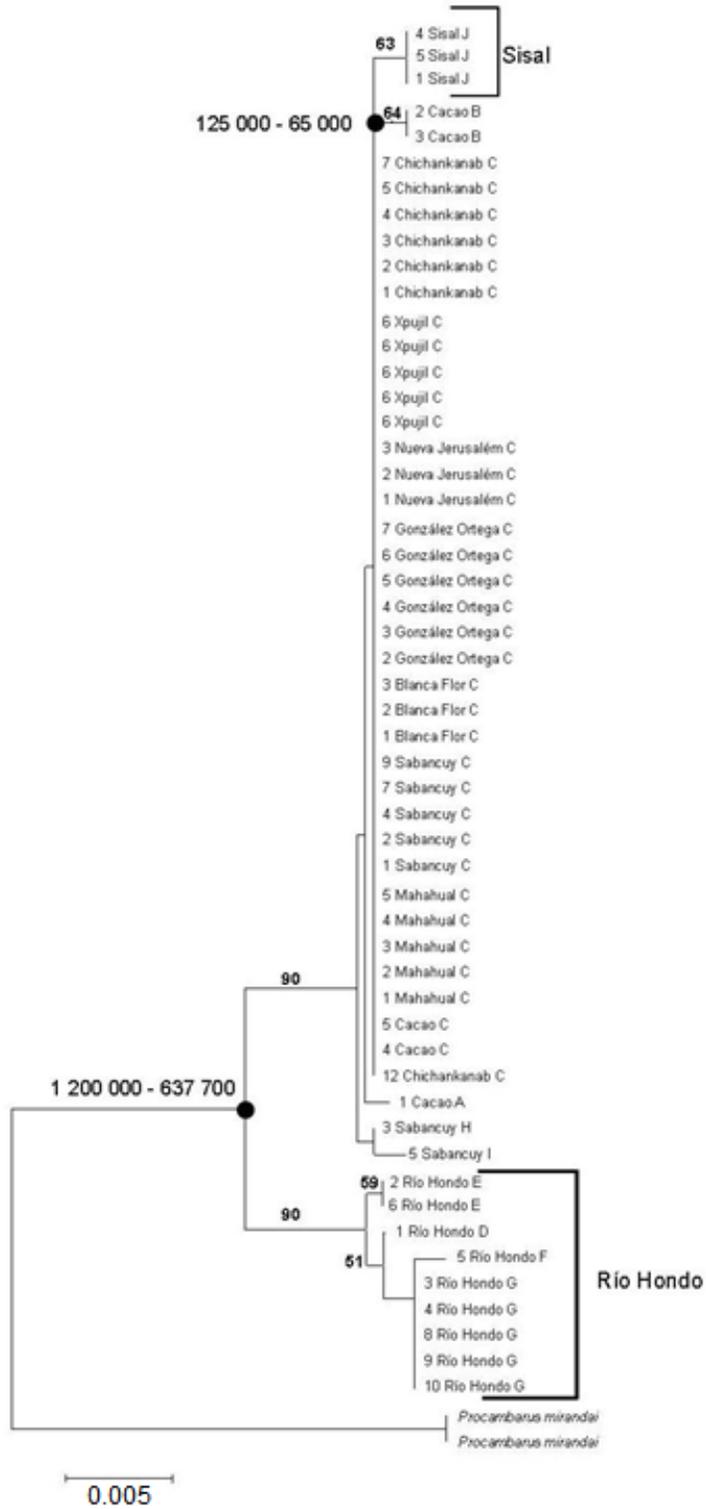


Figura 3. Árbol de distancia (*Neighbor Joining*) de 53 secuencias con distribución, haplotipos y grupo externo, basado en el modelo nucleotídico: HKY. Valores de *bootstrap* en la parte superior de las ramas. ● indican los nodos para los que fueron estimados los tiempos de divergencia en años.

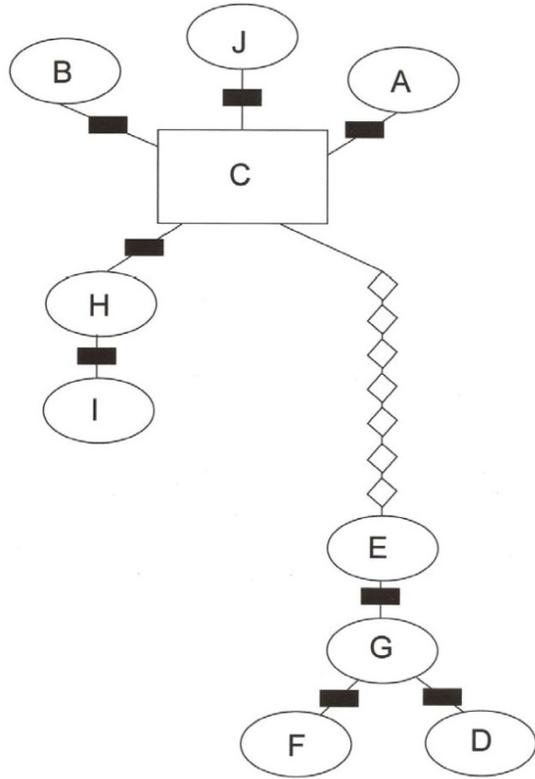


Figura 4. Red de haplotipos del COI mitocondrial en *Procambarus (A.) llamas* de la península de Yucatán. Los rectángulos grises indican transiciones, los rombos indican haplotipos intermedios no encontrados en la muestra. Las letras indican los diferentes haplotipos.

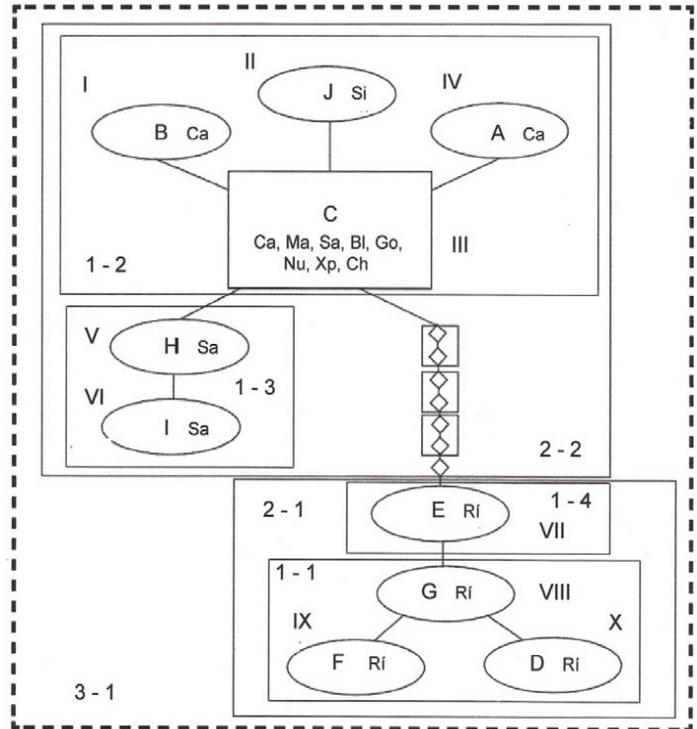


Figura 5. Clados anidados de la red de haplotipos. Dentro de cada óvalo se encuentra el haplotipo y las iniciales de las localidades donde se distribuye. Los números dentro de cada rectángulo indican el nivel de anidamiento. Sabancuy (Sa), Blanca Flor (Bl), Cacao (Ca), Chichankaanab (Ch), González Ortega (Go), Mahahual (Ma), Nueva Jerusalém (Nu), Río Hondo (Ri), Xpujil (Xp), Sisal (Si).

cercanas. La localidad de Cacao se encuentra a 6 km de la de Río Hondo; sin embargo, hay una diferencia altitudinal de 10 m entre ambas localidades y en Río Hondo el flujo del río va hacia el este, mientras que en Cacao el agua drena hacia el oeste. Este escenario sugiere que dos poblaciones que están geográficamente muy cerca en realidad están completamente aisladas una de otra.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al programa PAPIIT-DGAPA de la UNAM que financió el presente estudio mediante el proyecto IN214910-3 otorgado a Fernando Álvarez. Agradecemos también a Laura Márquez que ofreció amablemente su experiencia técnica para obtener las secuencias de ADN.

REFERENCIAS

Avise, J.C. 1999. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts Harvard University, Massachusetts, 417 pp.

Beddows, P. 2003. Cave hydrology of the Caribbean Yucatan coast. *Assoc. Mex. Cave Stud. Bull.*, Houston, 11: 1-96.

Botello, A. 2008. Estudios de variación genética en crustáceos de México. In: F. Álvarez & G. Rodríguez-Almaraz (eds.). *Crustáceos de México: estado actual de su conocimiento*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, pp. 459-487.

Botello, A. & F. Álvarez. 2010. Genetic variation in the stygobitic shrimp *Creaseria morleyi* (Decapoda: Palaemonidae): evidence of bottlenecks and re-invasions in the Yucatan Peninsula. *Biol. J. Linn. Soc.*, 99: 315-325.

- Buhay, J. & K. Crandall. 2005. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes. *Mol. Ecol.*, 14: 4259-4273.
- Buhay, J. & K. Crandall. 2008. Taxonomic revision of cave crayfishes in the genus *Orconectes*, subgenus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae) along the Cumberland Plateau, including a description of a new species, *Orconectes barri*. *J. Crust. Biol.*, 28(1): 57-67.
- Clement, M., D. Posada & K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9: 1657-1660.
- Covich, A. & M. Stuiver. 1974. Changes in oxygen 18 as a measure of long-term fluctuations in tropical lake levels and molluscan populations. *Limnol. Oceanogr.*, 19: 682-691.
- Dessauer, H.C., C.J. Cole & M.S. Hafner. 1996. Collection and storage of tissues. In: D. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 29-47.
- Fetzner, Jr., J.W. & K.A. Crandall. 2003. Linear habitats and the nested clade analysis: an empirical evaluation of geographic *versus* river distances using an Ozark crayfish (Decapoda: Cambaridae). *Evolution*, 57: 2101-2118.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoech, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3: 294-299.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hernández, B., M. Honey, M. Cortés & G. García. 2007. Filogeografía de aves mexicanas. In: L. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto de Ecología, México D.F., 592 pp.
- Hillis, D.M., B.K. Mable, A. Larson, S.K. Davis & E.A. Zimmer. 1996. Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 321-381.
- Hobbs, H.H. Jr. 1972. The subgenera of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Astacidae). *Smithson. Contrib. Zool.*, 117: 1-22.
- Knowlton, N., L.A. Weight, L.A. Solozzano, D.K. Mills & E. Birmingham. 1993. Divergence in protein, mitochondrial DNA and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science*, 260: 1629-1632.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Muñoz, A.N. 2009. Diferencia de la capacidad osmótica y metabolismo entre tres poblaciones del acocil *Procambarus llamasii* de la península de Yucatán. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 83 pp.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Posada, D. & A.R. Templeton. 2011. Inference key for the nested haplotype tree analysis of geographical distances. Available in: <http://darwin.uvigo.es/>.
- Posada, D., K.A. Crandall & A.R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.*, 9: 487-488.
- Rodríguez, M. 1999. Biología y sistemática de los cambáridos del sudeste de México y su potencial aprovechamiento en la acuicultura. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana, México, 101 pp.
- Rojas, A. 2008. Estructura mitocondrial (d-loop) de *Poecilia orri* en cenotes y humedales de la reserva de la biósfera de Sian Ka'an, Quintana Roo. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 49 pp.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis & H. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplifications of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis, version 2.00. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Schubart, C., R. Diesel & S. Hedges. 1998. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature*, 393: 363-365.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Templeton, R., E. Routman & C.A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the

- Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767-782.
- Torres, E. & F. Álvarez. 2012. Genetic variation in native and introduced populations of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Mexico and Costa Rica. *Aquat. Inv.*, 7: 235-241.
- Villalobos, A. 1954. Revisión de las especies afines a *Procambarus mexicanus* (Erichson), con descripción de nuevas formas. *An. Inst. Biol., UNAM*, 25(1-2): 364-371.
- Villalobos, A. 1955. Cambarinos de la fauna mexicana (Crustacea, Decapoda). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 290 pp.
- Wilkins, H. 1982. Regressive evolution and phylogenetic age: the history of colonization of freshwaters of Yucatan by fish and Crustacea. *Assoc. Mex. Cave Stud. Bull., Houston*, 8: 237-243.

Received: 19 May 2012; Accepted: 19 October 2012