



Universidad de La Habana  
Centro de Investigaciones Marinas



## **Filogeografía del pez endémico de Cuba *Limia vittata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**



Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en  
Biología Marina y Acuicultura con Mención en Biología Marina

Lic. Sheila Rodríguez Machado

La Habana, 2017



Universidad de La Habana  
Centro de Investigaciones Marinas



## **Filogeografía del pez endémico de Cuba *Limia vittata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**

Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en  
Biología Marina y Acuicultura con Mención en Biología Marina

**Autora:** Lic. Sheila Rodríguez Machado  
Instituto de Ciencias del Mar

**Tutor:** Dr. Erik García Machado  
Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana

La Habana, 2017

*A mi abuela Ofelia*

*A mi mamá y mi papá*

## **Agradecimientos**

*Mi mayor gratitud es para mis padres, que siempre han estado a mi lado y me han dado todo su apoyo, especialmente en la etapa final de la escritura de la tesis, sin ellos hubiera sido imposible.*

*Que haya comenzado a trabajar genética molecular se lo debo al profe José, que siempre está pendiente de mí y hace cuatro años me presentó al profe Erik, a quien le agradezco por haber aceptado trabajar conmigo y por su confianza. Muchas gracias por sus valiosos conocimientos y por darle el rumbo adecuado a todas mis ideas. Además, le agradezco a ambos su apoyo en cada una de las oportunidades de financiamiento y superación.*

*The Rufford Foundation financió los viajes de campo y parte del equipamiento de trabajo. Los viajes de campo también fueron posibles gracias a la ayuda de muchas personas:*

*En la mayor parte de Oriente, Ansel Fong, Rolando Teruel y Ramón Cueto (BIOECO) me ayudaron con la organización de la expedición, parte de la logística y paciencia durante las colectas, además, Isis y Teruel amablemente nos brindaron su casa.*

*En Holguín, Nils y Alejandro Navarro me ayudaron con parte de la gestión del viaje, Lili Teruel me ofreció su casa y Alejandro Fernández (CISAH) y Rolando Teruel ayudaron con los muestreos.*

*En el Parque Nacional “Península de Guanahacabibes”, muchísimas gracias a José Luis Linares y Roberto Varela, que fueron con nosotros a todos los acuatorios e incluso colectaron con cocodrilos cerca... Le agradezco también a su director, Lázaro Márquez, por el apoyo logístico. El hospedaje durante las dos expediciones fue gracias a Pernier Valdés, director del Radar Meteorológico “La Bajada”.*

*Le agradezco al CIM y sus trabajadores por la acogida durante el tiempo que trabajé allí. A todos los profesores de la maestría por brindar sus conocimientos. Muchas gracias a Gaby por su ayuda y sobre todo por su paciencia cuando empecé a trabajar en el laboratorio ... A Elida y María, no sólo por el trabajo compartido sino también por las horas en el laboratorio. Finalmente, le agradezco a Elaine y a las profes Bety y Ana María por brindarme el tiempo para terminar de escribir antes de entregar el documento y a estas últimas por sus recomendaciones durante la predefensa.*

*La secuenciación de las muestras fue gracias al apoyo de la Universidad Paris Diderot (Paris 7) y del laboratorio EGCE, CNRS Gif sur Yvette, Francia, en especial de Didier Casane e Isabelle Germon. A Didier también muchas gracias por su ayuda en la búsqueda de financiamiento. Otra parte de las muestras fueron amplificadas y secuenciadas en el Laboratorio Molecular del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) en Naos, Panamá. Muchísimas gracias a Eyda Gómez y Gisela R. Reina por su ayuda durante mi estancia allá, al igual que a los doctores Harilaos Lessios y Ross Robertson por haber aceptado ser los supervisores de mi investigación. A Julio César González Pagés por el apoyo logístico al inicio del viaje.*

*Le agradezco al Instituto de Oceanología, ahora Instituto de Ciencias del Mar, por permitirme conocer las maravillas del mar. Además, por el tiempo para que fuera a los viajes de campo y por el alcohol para mis muestras; en especial, a las jefas de Dpto. Mayelín, Ariagna y Linnet. Gracias también al consejo científico y a todos los que participaron, por sus recomendaciones antes de la predefensa. A Linnet y a Indra por la impresión del documento. En fin, gracias a todos por su preocupación, especialmente en los últimos tiempos.*

*Muchas gracias a Jessy por su ayuda en el laboratorio y por aclararme todas las dudas al inicio del procesamiento de los resultados. A Mancina por su mentalidad positiva y por ayudarme con el análisis de morfometría geométrica. A la profe Yoyi por haber aceptado ser la oponente de la tesis.*

*Muchísimas gracias a mi amiga Zenaida y su familia, por su apoyo incondicional, sus gestiones y su constante preocupación. Que sería de mi sin ellos!*

*A todos los que siempre están al tanto y brindando su ayuda: mi amiga Isis, tío Hector, Iris, Ernesto, Charo, Raimundo y Alain.*

*Por último, quiero agradecer a mi novio Michel por TODO su amor y apoyo. Mucho de lo que he aprendido en estos casi cinco años ha sido gracias a él. Los viajes de campo y las colectas no hubieras sido posibles sin su ayuda, aunque paciencia no era lo que más tenía... Gracias por tantas charlas productivas, por ocuparte de mis cosas cuando yo no puedo, o remoloneo, y por hacer que quiera superarme cada día más...*

## Resumen

*Limia vittata* es una especie endémica, monotípica y distribuida fundamentalmente en zonas bajas del archipiélago cubano, desde ríos hasta lagunas de agua salada. La baja divergencia genética entre sus poblaciones, al menos en la región occidental, sugiere que es una sola especie. Sin embargo, esta información necesita ser corroborada con datos del resto del país. Dado que su origen puede ser diferente al propuesto para las otras especies de poecílidos del archipiélago; esta especie constituye una oportunidad para interpretar los procesos biogeográficos que moldearon la evolución de la ictiofauna dulceacuícola cubana. El objetivo principal fue analizar la diversidad genética y fenotípica de *Limia vittata* con un enfoque filogeográfico. Los análisis moleculares se basaron en los genes mitocondriales citocromo oxidasa I y la región no codificadora. El análisis de la forma del cuerpo se basó en morfometría geométrica. *Limia vittata* presentó una alta divergencia intraespecífica. Esta especie está formada por tres grupos genéticos discretos coherentes con la distribución geográfica: 1- Oeste de Pinar del Río, 2- Isla de la Juventud/Artemisa/Habana/Matanzas/Oeste del centro de Cuba y 3- Este del centro de Cuba/Oriente. La prueba de hipótesis filogeográfica sugiere que la evolución de *L. vittata* siguió un modelo de salto piedra a piedra, con origen en la región oriental y dispersiones sucesivas hacia la región occidental. El proceso de dispersión estuvo seguido de aislamiento geográfico que produjo la diferenciación entre las poblaciones. Las variaciones en la forma del cuerpo de *L. vittata* no reflejaron las variaciones genéticas encontradas con los marcadores moleculares. Sin embargo, las diferencias detectadas pudieran estar determinadas por otros factores como el tipo de ecosistema, la presión por depredadores, etc., de manera que el aislamiento geográfico tenga poca o ninguna influencia.

**Palabras claves:** aislamiento por distancia, alopatria, biogeografía, dispersión, peces de agua dulce

## Abstract

*Limia vittata* is an endemic and monotypic species inhabiting lowland ecosystems in the Cuban archipelago, from rivers to brackish lagoons. The low genetic divergence among their populations, at least in western Cuba, suggests that it is a single species. However, this hypothesis needs further corroboration by molecular data from others regions of the country. Given the possible different origin of this species with respect to those proposed for other Cuban poeciliid fishes, it represents an opportunity to interpret the biogeographic process shaping the evolution of Cuban freshwater ichthyofauna. The main aim was to analyze the genetic and phenotypic diversity of *L. vittata* under a phylogeographic perspective. Molecular analyzes were based on the mitochondrial genes cytochrome oxidase I and the non-coding region. The analysis of the body shape was based on geometric morphometric. *Limia vittata* showed high intraspecific divergence. This species comprises three discrete genetic groups consistent with the geographic distribution: 1- Western Pinar del Río, 2- Isla de la Juventud/Artemisa/Habana/Matanzas/West of Central Cuba, and 3- East of Central Cuba/Eastern Cuba. The phylogeographic hypotheses test suggests that the evolution of *L. vittata* followed a stepping stone model, which origin was in the eastern region, with subsequent dispersal events to the western region. Dispersion was followed by geographic isolation enhancing differentiation among populations. Body shape variations in *L. vittata* did not reflect the genetic diversification found using molecular markers. However, such variations could be determined by other factors such as ecosystem type, predators, etc., thus, geographic isolation had little or none influence on it.

**Key words:** isolation by distance, allopatry, biogeography, dispersal, freshwater fish

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>  | <b>5</b>  |
| I.1.1. Características e importancia de la familia Poeciliidae                    | 5         |
| I.1.2. Familia Poeciliidae en Cuba  | 6         |
| I.2. Colonización de Cuba por los poeciliidos: teorías e hipótesis                | 8         |
| I.3. Filogeografía del género <i>Limia</i> Poey, 1854                             | 11        |
| I.4. Comprensión de la evolución de las especies: uso de herramientas moleculares | 13        |
| I.5. El análisis de la forma del cuerpo a partir de morfometría geométrica        | 14        |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>17</b> |
| II.1. Área de estudio y método de muestreo  | 17        |
| II.2. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN                            | 18        |
| II.3. Diversidad y estructura genética  | 19        |
| II.4. Relaciones filogenéticas  | 20        |
| II.5. Prueba de escenarios de dispersión y vicarianza                             | 20        |
| II.6. Demografía histórica  | 22        |
| II.7. Análisis morfométrico   | 23        |
| II.8. Análisis estadístico  | 24        |
| <b>III. RESULTADOS</b>  | <b>26</b> |
| III.1. Diversidad y estructura genética poblacional                               | 26        |
| III.2. Relaciones entre haplotipos y relaciones entre grupos                      | 27        |
| III.3. Prueba de escenarios de dispersión y vicarianza                            | 32        |
| III.4. Demografía histórica   | 32        |
| III.5. Variabilidad en la forma del cuerpo  | 34        |
| <b>IV. DISCUSIÓN</b>  | <b>38</b> |
| IV.1. Diferenciación intraespecífica  | 38        |
| IV.2. Dispersión vs fragmentación   | 41        |
| IV.3. Diversidad genética y demografía  | 47        |
| IV.4. Morfología y grupos geográficos   | 49        |
| IV.5. Consideraciones para el manejo y conservación                               | 51        |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>53</b> |
| <b>RECOMENDACIONES</b>  | <b>54</b> |
| <b>BIBIOLGRAFÍA</b>   | <b>55</b> |
| <b>ANEXOS</b>   | <b>77</b> |



## INTRODUCCIÓN

La familia Poeciliidae incluye más de 260 especies agrupadas en 28 géneros (Nelson *et al.*, 2006; Jelks *et al.*, 2008). Los integrantes de esta familia son peces de pequeño tamaño, vivíparos y con un marcado dimorfismo sexual (Rosen y Bailey, 1963). Aunque son nativos de América (Rosen y Bailey, 1963; Ghedotti y Wiley, 2002), están distribuidos a nivel mundial por su uso como controladores biológicos de mosquitos y a través del comercio de mascotas (Lucinda, 2003; Lucinda y Reis, 2005). Además, los poecílidos han sido usados como modelos biológicos de vertebrados tanto en las ciencias biológicas en general (Evans *et al.*, 2001) como en la medicina moderna (Schartl, 2014).

Los avances más recientes sobre la filogenia y la filogeografía de los poecílidos han permitido resolver muchos de los problemas concernientes a las relaciones evolutivas entre y dentro de las especies, principalmente en el Caribe y Las Antillas (Hrbek *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2016; Reznick *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunos grupos todavía quedan vacíos de información que impiden tener una idea clara acerca de su evolución y de los procesos que en esta han intervenido. En este sentido, los estudios moleculares han sido las mejores herramientas para responder muchas de las interrogantes sobre la evolución y biogeografía de la ictiofauna del Caribe (Echelle *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 2011; Alda *et al.*, 2013; Babley *et al.*, 2015).

Por otra parte, las investigaciones empleando técnicas de morfometría geométrica también han demostrado ser útiles en el análisis de relaciones evolutivas entre y dentro de las especies cuando son usadas conjuntamente con estudios filogenéticos (Barluenga *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2007; Riesch *et al.*, 2016). Sin embargo, la principal ventaja de aplicar

morfometría geométrica en poecílicos es que ha aportado evidencias evolutivas irrefutables sobre la reacción de poblaciones de varias especies a diferentes presiones selectivas (e.g., Tobler *et al.*, 2008; Langerhans y Makowicz, 2009; Tobler *et al.*, 2011). De hecho, numerosos estudios han demostrado que variaciones en la forma del cuerpo no son predictores de relaciones filogenéticas y que el aislamiento geográfico no es el principal factor determinado dichas variaciones (Hankison *et al.*, 2006; Langerhans *et al.*, 2007; Cruz, 2014). Se ha probado que diferencias en la forma del cuerpo se relacionan con diferentes regímenes de depredación (Langerhans *et al.*, 2004), el tipo de ecosistema (Zúñiga *et al.*, 2007) y la tolerancia a factores abióticos extremos (Tobler *et al.*, 2011).

El archipiélago cubano tiene la mayor riqueza en cuanto a ictiofauna dulceacuícola en Las Antillas (Rosen y Bailey, 1963; Burgess y Franz, 1989; Vergara, 1992). La familia Poeciliidae constituye el grupo dominante en términos de número de especies. En Cuba esta familia está compuesta por 12 especies distribuidas en 4 géneros: *Girardinus* (7), *Gambusia* (3), *Limia* (1) y *Quintana* (1), diez de las cuales son endémicas (Ponce de León y Rodríguez, 2010). Investigaciones recientes donde se empleó el código de barras de ADN (Lara *et al.*, 2010) confirmaron estas especies de poecílicos, a la vez que revelaron varias especies crípticas. Nuevos linajes evolutivos han sido identificados, por ejemplo, para *Gambusia puncticulata* (Lemus, 2013) y *G. punctata* (Gutiérrez, 2016).

*Limia vittata* (Guichenot 1853) es una especie endémica, monotípica y distribuida fundamentalmente en zonas bajas del archipiélago cubano. La baja divergencia genética entre sus poblaciones, al menos en la región occidental (Lara *et al.*, 2010), sugiere que es una sola especie. Sin embargo, la falta de datos moleculares de las poblaciones de las regiones central y oriental impide tener una idea clara sobre la evolución de esta especie en

el archipiélago. *Limia vittata* representa una especie importante en la interpretación de los procesos biogeográficos que moldearon la distribución y evolución de la ictiofauna dulceacuícola cubana, dado que su origen puede ser diferente al propuesto para las otras especies de poecílidos del archipiélago.

*Limia vittata* habita en diferentes tipos de ecosistemas, desde ríos y lagunas salobres hasta lagunas saladas sin intercambio con agua dulce. Esto nuevamente sitúa a esta especie como modelo potencial para analizar patrones fenotípicos asociados a diferentes ambientes y al grado de divergencia genética entre poblaciones. Esta sería la primera investigación en peces cubanos donde se lleve a cabo un análisis comparativo de variación geográfica a nivel de ADNmt combinado con la forma del cuerpo usando morfometría geométrica.

Sobre la base de los datos disponibles relacionados con la baja divergencia genética entre poblaciones alopátricas de *L. vittata* en el occidente de Cuba y su capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas, la **hipótesis científica** ( $H_0$ ) de esta investigación es la siguiente: el género *Limia* en Cuba comprende una sola especie con poblaciones geográficas genéticamente estructuradas y con patrones fenotípicos no asociados a dicha estructura.

Predicciones:

- Si la hipótesis ( $H_0$ ) es verdadera: se identificarán particiones genéticas significativas, pero con niveles de divergencia genética inferiores a los reconocidos entre especies del mismo género y géneros afines y que no mostrarán asociación con los rasgos fenotípicos analizados.
- Si la hipótesis es falsa: existirán particiones genéticas (*i.e.*, especies) con niveles de divergencia iguales o superiores a los reconocidos entre especies del mismo género y

géneros afines, que pueden estar correlacionadas (*i.e.*, morfoespecies) o no (*i.e.*, crípticas) con los rasgos fenotípicos analizados.

*Objetivo general:*

Analizar la diversidad genética y fenotípica de *Limia vittata* en Cuba

*Objetivos específicos:*

- 1.** Analizar las relaciones filogeográficas y la diversidad de haplotipos de ADNmt entre las poblaciones de *L. vittata* en Cuba.
- 2.** Caracterizar las variaciones en cuanto a forma del cuerpo entre las poblaciones de *L. vittata* en Cuba.
- 3.** Analizar si las variaciones geográficas a nivel de ADNmt se corresponden con las variaciones fenotípicas en la forma del cuerpo entre las poblaciones de *L. vittata*.

## I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### I.1.1. Características e importancia de la familia Poeciliidae

La familia Poeciliidae está formada por peces de pequeño tamaño (20-200 mm, largo estándar), con un marcado dimorfismo sexual, presencia de fertilización interna y todos, excepto la especie suramericana *Tomemurus gracilis*, son vivíparos (Regan, 1913; Rosen y Gordon, 1953; Rosen y Bailey, 1963). Además, los machos se caracterizan por la modificación de los radios 3, 4 y 5 de la aleta anal en un órgano intromitente denominado gonopodio (Lucinda y Reis, 2005). De acuerdo con la propuesta de Rosen y Bailey (1963), posteriormente formalizada por Parenti (1981), esta familia está formada por tres subfamilias: Aplocheilichthyinae, Fluviphylacinae y Poeciliinae. Sin embargo, contrario a las relaciones propuestas por Parenti (1981), estudios moleculares recientes encontraron que Anablepidae es el grupo hermano de Poeciliinae y que a su vez Fluviphylacinae es hermano del clado (Poeciliinae + Anablepidae) a la exclusión de Aplocheilichthyinae (Reznick *et al.*, 2017).

La subfamilia Poeciliinae es la de mayor distribución y diversidad, con más de 250 especies y entre 22-29 géneros (Lucinda, 2003; Lucinda y Reis, 2005). Se encuentra desde el sureste de Estados Unidos hasta el noreste de Argentina, incluyendo Las Antillas (Rosen y Bailey, 1963). Los géneros más diversos son: *Gambusia* (43 especies), *Poecilia* (34 especies), *Xiphophorus* (28 especies), *Poeciliopsis* (23 especies), *Phalloceros* (22 especies) y *Limia* (21 especies). El número de especies de los restantes miembros varía desde 12 especies en el género *Brachyrhaphis* hasta cinco géneros monotípicos.

Los poecílidos han sido ampliamente usados como modelos biológicos en estudios sobre ecología, reproducción, historia de vida, conducta, evolución, medicina y muchos otros campos (*e.g.*, Langerhans *et al.*, 2004; Dadda *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2010; Ponce de León *et al.*, 2013; Pollux *et al.*, 2014; Schartl, 2014). Por otra parte, constituyen eslabones claves de las tramas tróficas en los ecosistemas que habitan, donde entre otros, son depredadores de larvas de mosquitos (control de vectores) (Fimia *et al.*, 2010). Además, son componentes importantes en el comercio de mascotas a través de los acuarios (Lucinda, 2003; Lucinda y Reis, 2005).

### 1.1.2. Familia Poeciliidae en Cuba

La fauna de peces de agua dulce de Cuba está agrupada en 9 órdenes, 15 familias y 46 especies (Rodríguez-Machado y Ponce de León, 2017) y es la más diversa de Las Antillas, con un elevado endemismo (Rosen y Bailey, 1963; Burgess y Franz, 1989; Vergara, 1992). A su vez, la familia Poeciliidae presenta el mayor número de especies dentro de los peces del archipiélago cubano. Está compuesta por 12 especies distribuidas en 4 géneros: *Girardinus* (7), *Gambusia* (3), *Limia* (1), y *Quintana* (1). Además de los géneros endémicos *Girardinus* y *Quintana*, *Gambusia punctata* y *Limia vittata* son especies endémicas (Ponce de León y Rodríguez, 2010).

Los integrantes de esta familia presentan un patrón de distribución bien marcado en Cuba. Algunos se encuentran ampliamente distribuidos en zonas bajas de todo el país, como *Limia vittata*, *Girardinus metallicus*, *Gi. falcatus* y *Gambusia puncticulata*, mientras que otros están restringidos a zonas montañosas en la región occidental como *Gi. creolus*, *Gi. uninotatus* y *Gi. cubensis* o en la región central y oriental como *Gi. denticulatus* (Ponce de

León y Rodríguez, 2010). Además, presentan una amplia variedad de uso de hábitats: algunas especies sólo están en ecosistemas de agua dulce y otras, como *L. vittata*, *Gambusia rhizophorae* y *Ga. puncticulata*, pueden ser encontradas en agua salobre y salada.

Durante años la información disponible sobre los poecílidos en Cuba fue escasa y se limitaba a estudios sobre taxonomía y sistemática (Eigenmann, 1903; Poey, 1854; Rivas, 1958; 1963; Vergara, 1992). Ya en las últimas dos décadas ha habido un aumento en el conocimiento sobre este grupo de vertebrados, fundamentalmente sobre sus historias de vida (Ponce de León *et al.*, 2011; Ponce de León, 2012) y relaciones filogenéticas (Doadrio *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2010; Lemus, 2013; Gutiérrez, 2016). En particular, Lara *et al.* (2010) revolucionaron nuestros conocimientos sobre la diversidad genética de los peces de agua dulce de Cuba. En general, sus resultados coincidieron con la clasificación taxonómica actual a nivel de familia, género y especie, a la vez que encontraron varios linajes crípticos, tanto dentro de la familia Poeciliidae como en otras familias (García-Machado *et al.*, 2011; Ponce de León *et al.*, 2014).

Desde un punto de vista taxonómico, la clasificación de algunos poecílidos cubanos ha estado y está sujeta a discusión. Los dos ejemplos son el género *Girardinus* y el complejo de especies *Gambusia puncticulata*. El caso del género *Girardinus* fue dividido en cuatro géneros, *Dactylophallus*, *Girardinus*, *Glaridichthys* y *Toxus*, por Rivas (1958) pero tratado como un único género, *Girardinus*, por Rosen y Bailey (1963). Doadrio *et al.* (2009) propusieron restablecer la clasificación de Rivas (1958), pero Lara *et al.* (2010) critican esta decisión sobre la base del análisis de la divergencia genética entre las seis especies

incluidas en su trabajo. Estos autores argumentaron que el nivel de divergencia genética entre dichas especies coincide con el rango de variación presente en otros géneros dentro de Poeciliidae como *Limia* y *Gambusia*. El complejo de especies cubanas afines a *Gambusia puncticulata* (*G. baracoana*, *G. bucheri*, *G. howelli*, y *G. monticola*) es otra interrogante sin resolver. En este sentido, Fink (1971) asumió que se trataba de una especie con varias subespecies, mientras que Rauchenberger (1989) planteó que se trata de taxones diferentes. Sin embargo, seguir un criterio basado solamente en los caracteres morfológicos usados, sin dudas, dificulta que se llegue a un consenso. Con el uso de técnicas moleculares Lara *et al.* (2010) comenzaron a dilucidar esta problemática y actualmente se trabaja para esclarecer dichas entidades taxonómicas (Lemus, 2013).

### *1.2. Colonización de Cuba por los poecílidos: teorías e hipótesis*

El Caribe insular es un área compleja desde un punto de vista geológico, paleogeográfico y evolutivo. Constituye uno de los archipiélagos tropicales más grandes del planeta, sólo superado por las islas del Indo-pacífico. En términos de biodiversidad, se caracteriza por altos niveles de endemismo en vertebrados. Esto los ha convertido en el centro de atención de numerosas investigaciones biogeográficas (*e.g.*, Dávalos, 2007; Vázquez-Miranda *et al.*, 2007; Losos, 2009; Alonso *et al.*, 2012). En particular, los poecílidos han sido usados como modelos biológicos para complementar las teorías e hipótesis sobre el origen y evolución del Caribe (*e.g.*, Rosen, 1978; Hrbek *et al.*, 2007). Sin embargo, la ausencia de datos geológicos claves (MacPhee e Iturralde-Vinent, 2005) y de evidencia fósil (Burgess y Franz, 1989) dificulta las interpretaciones filogenéticas o paleogeográficas.



En la actualidad existen dos hipótesis principales sobre la colonización de Las Antillas: Pitman *et al.* (1993) y Pindell (1994) sugirieron un proceso de colonización a partir de América Central, a través de un puente de tierra entre Yucatán y Las Antillas en el Cenozoico temprano, mientras que Iturralde-Vinent y MacPhee (1999) y MacPhee e Iturralde-Vinent (2005) propusieron que hubo un puente de tierra entre América del Sur, las Antillas Menores y las Antillas Mayores durante la transición Eoceno-Oligoceno. La unión temporal de todas estas islas es conocida como GAARlandia (por sus siglas en inglés *Greater Antilles Aves Ridge landspan*). Han sido propuestas otras rutas de colonización (Eigenmann, 1903; Matthew, 1915; Rivas, 1958; Rosen y Bailey, 1963) basadas en la distribución actual de los peces, pero básicamente coinciden con las dos antes expuestas. Del mismo modo, han sido propuestas dos vías de dispersión principales: dispersión por mar (Matthew, 1915; Darlington, 1938; Rosen y Bailey, 1963; Briggs, 1984; 1987) y puentes de tierra temporales (Schuchert, 1935; Darlington, 1938; Rivas, 1958, 1986). Alternativamente, Rosen (1976; 1985) propone que la vicarianza es un proceso generador de los patrones de distribución observados.

Las vías de dispersión propuestas coinciden con la proximidad actual de Cuba y cada sitio propuesto y reflejan, parcialmente, las relaciones filogenéticas recientemente encontradas entre diferentes familias, géneros y especies de peces de agua dulce de Cuba y sus parientes más cercanos en el Caribe (*e.g.*, Perdices *et al.*, 2005; Echelle *et al.*, 2006; Říčan *et al.*, 2012; Galván-Quesada *et al.*, 2016). Sin embargo, hoy en día es imposible proponer una teoría o hipótesis que sólo incluya una vía de origen y dispersión por la cual los poecílicos llegaron a las islas del Caribe.

De acuerdo con la distribución actual de *Quintana atrizona* y la mayoría de las especies del género *Girardinus*, limitada al occidente de Cuba (Ponce de León y Rodríguez, 2010) y su cercanía filogenética con *Carlhubbsia* (basado en datos morfológicos, Rosen y Bailey, 1963), fue propuesta una ruta migratoria desde Centroamérica (Rivas, 1958; Rosen y Bailey, 1963). Sin embargo, Hrbek *et al.* (2007) basado en el análisis de genes nucleares y mitocondriales, interpretó la relación cercana entre las especies cubanas y otras especies de Norte y Centroamérica como una segunda invasión a estas regiones a través de GAARlandia. Lo más interesante de este estudio es que la posición ancestral de las especies cubanas respecto a las centroamericanas es similar a lo encontrado entre el mamporro (*Ophisternon aenigmaticus*) en Cuba y sus parientes continentales (Perdices *et al.*, 2005), así como entre los cíclidos del género antillano *Nandopsis* y sus géneros hermanos en Centroamérica (Říčan *et al.*, 2012). Ambos ejemplos apoyan lo planteado por Hrbek *et al.* (2007) y que recientemente fue confirmado por Reznick *et al.* (2017).

El origen y diversidad del género *Gambusia* ha sido menos polémico. Todos los miembros habitan ecosistemas de agua dulce, salobre e incluso algunas toleran el agua salada y el género está distribuido desde el sureste de Estados Unidos hasta Centroamérica y en Las Antillas. Debido a esta tolerancia a la salinidad, se puede inferir que sus ancestros llegaron a Cuba desde Centroamérica a través del mar (Rosen y Bailey, 1963). Sin embargo, estudios moleculares en Cuba sugieren un escenario más amplio y complejo, fundamentalmente dentro del complejo de especies *puncticulata* (Lemus, 2013). Las relaciones filogenéticas encontradas entre las especies conocidas (*G. puncticulata sensu lato*) y los linajes crípticos sugieren que: 1) las especies cubanas relacionadas con *G. puncticulata* del occidente están cercanamente relacionadas con las especies de *Gambusia*

de Centroamérica, en particular *G. yucatanana*, y 2) el archipiélago cubano pudo ser un área de origen para otras especies continentales y antillanas de este género. Esto último coincide con lo encontrado para las lagartijas del género *Anolis* del complejo de especies “*carolinensis*” (Glor *et al.*, 2005).

### *1.3. Filogeografía del género Limia Poey, 1854*

El género *Limia* es endémico de las Antillas Mayores. La Española es el centro de diversificación con 18 especies, mientras que en Jamaica, Islas Caimán y Cuba sólo se encuentra una especie. La clasificación taxonómica del género todavía es debatida. Fue propuesto por Poey (1854) como género, luego Rosen y Bailey (1963) y Rauchenberger (1988) lo tratan como subgénero de *Poecilia*, mientras que Rivas (1978; 1980) lo restituyó dos veces a nivel de género. Actualmente hay desacuerdo en la clasificación de este género: algunos autores lo tratan como tal (Rodríguez, 1997; Hamilton, 2001; Lara *et al.*, 2010) mientras que otros lo asumen como subgénero (Meredith *et al.*, 2010; 2011).

Rosen y Bailey (1963) propusieron una ruta de colonización para los ancestros de *Limia* a través del elevador de Nicaragua hasta Jamaica, con diversificaciones monotípicas en Cuba e Islas Caimán. Esto significó que *L. melanogaster* (Jamaica) fuera asumida como la especie hermana del resto de las especies. Sin embargo, el primer análisis filogenético molecular del género no encontró soporte para esto (Hamilton, 2001). Por el contrario, cuando fueron incluidas más especies y genes mitocondriales y nucleares (Weaver *et al.*, 2016), *L. melanogaster* fue encontrada como la especie hermana del resto de las especies en una filogenia bien soportada. Sin embargo, estos autores encontraron un escenario muy diferente al anteriormente propuesto para la colonización del grupo.

Weaver *et al.* (2016) probaron tres hipótesis sobre la colonización y diversificación de los peces en Las Antillas: dispersión marina (Briggs, 1984), vicarianza durante el Cretácico tardío (Rosen, 1976) y el puente terrestre entre Suramérica y Las Antillas durante la transición Eoceno-Oligoceno (Iturralde-Vinent y McPhee, 1999). Como ha sido encontrado recientemente para otros grupos de peces de agua dulce que también habitan Cuba (Perdices *et al.*, 2005; Echelle *et al.*, 2006; Říčan *et al.*, 2012; Galván-Quesada *et al.*, 2016), los resultados sugieren un proceso de colonización a través de GAARlandia, en lo que sería el tercer y último evento de colonización de Las Antillas por poecílidos (Hrbek *et al.*, 2007). En la actualidad todavía permanece la incógnita sobre el medio, es decir, si los peces se dispersaron por mar a través de cortas distancias o por canales de agua dulce mientras estuvo GAARlandia.

La especie hermana de *L. vittata* es la especie de Islas Caimán, *L. caymanensis*. Esto fue propuesto por Rivas y Fink (1980) y confirmado posteriormente por diferentes estudios moleculares (Hamilton, 2001; Weaver *et al.*, 2016). Hasta ahora, la única información disponible sobre la diversidad genética de *Limia vittata* está basada en siete poblaciones del occidente de Cuba y dos en los cayos del centro del país (Lara *et al.*, 2010). En general, la divergencia genética fue baja [ $d=0,8 \pm 0,2\%$  ( $0-1,9 \pm 0,5\%$ )], siendo la población de Guanahacabibes más divergente respecto al resto de las localidades. Se debe notar que los valores fueron superiores a los estimados para el resto de los poecílidos, excepto para *Girardinus denticulatus*, *G. microdactylus* y *Gambusia punctata sensu stricto*; y a los estimados para especies de otras familias que habitan la isla.

#### *I.4. Comprensión de la evolución de las especies: uso de herramientas moleculares*

Después del descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1953, el uso de técnicas moleculares revolucionó nuestro entendimiento sobre numerosos fenómenos biológicos (*e.g.*, Hebert *et al.*, 2003; Scharl *et al.*, 2013). En particular, la aplicación de estas herramientas para analizar la evolución biológica ha permitido proponer hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre las especies (Galván-Quesada *et al.*, 2016; Weaver *et al.*, 2016), complementar muchas de las teorías paleogeográficas actuales (Hrbek *et al.*, 2007; Řičan *et al.*, 2012), estudiar el flujo de genes (Crispo *et al.*, 2006) y la evolución del genoma (Scharl *et al.*, 2013), por sólo citar algunos ejemplos.

Además, el uso de técnicas moleculares aplicadas al desarrollo de hipótesis sobre la evolución de las especies se ha convertido en una magnífica alternativa al uso de caracteres morfológicos para describir las relaciones entre linajes. En el caso de los poecílicos, ha permitido evaluar (Lydeard *et al.*, 1995a) la utilidad de algunos caracteres morfológicos como el gonopodio y sus suspensorios (Rosen y Bailey, 1963; Rauchenberger, 1989; Rodríguez, 1997), como principales caracteres de valor taxonómico. Sin embargo, los resultados obtenidos al usar caracteres moleculares dependerán de factores intrínsecos como la existencia de homoplasia (Estoup *et al.*, 2002; Engstrom *et al.*, 2004), así como de otros que dependen o no de los investigadores. Entre estos se pueden citar la selección del tipo y número de genes a analizar y el número de especies (*e.g.*, Breden *et al.*, 1999; Meredith *et al.*, 2010; 2011) y la ausencia de un registro fósil, (Morlon *et al.*, 2011; Etienne *et al.*, 2012) como es el caso de los poecílicos (Burgess y Franz, 1989), respectivamente.

Los genes mitocondriales (ADNmt) son de los marcadores moleculares más usados para analizar la diversidad genética de las especies, sus relaciones filogeográficas, etc. (Futuyma, 2013). Su éxito está dado fundamentalmente porque se hereda sólo por vía materna, su recombinación es prácticamente nula, tiene múltiples copias en la célula, muestra gran variabilidad intraespecífica y tiene una alta tasa de mutación a nivel de nucleótido (Avise, 2000; Hudson y Turelli, 2003). De hecho, la rapidez con que evoluciona el ADNmt, ha permitido que detectar cambios a nivel poblacional que a nivel de ADN nuclear no son apreciables (Bowen *et al.*, 2014). No obstante, algunos autores recomiendan tener cuidado al usar este tipo de marcador pues en algunos casos puede llevar a interpretaciones erróneas (Galtier *et al.*, 2009).

Dentro del ADNmt, la región no codificadora (RNC) es útil en estudios de microevolución. Por lo general, esta región evoluciona mucho más rápido que el resto del genoma mitocondrial (hasta cinco veces mayor; Meyer, 1993) debido a la alta tasa de sustitución nucleotídica, lo que se refleja en un alto nivel de polimorfismo intraespecífico (Brown, 1985). Esto debe estar dado fundamentalmente por su limitada función y menores presiones selectivas. Sin embargo, estudios recientes en peces de agua dulce y otros vertebrados han demostrado que la tasa de evolución de este gen es más variable de lo que se creía y que frecuentemente está relacionado con el nivel taxonómico que se compare (*e.g.*, Roukoni y Kvist, 2002; Tang *et al.*, 2006).

#### *1.5. El análisis de la forma del cuerpo a partir de morfometría geométrica*

El avance en las ciencias biológicas ha ido desde estudiar los procesos y fenómenos de forma descriptiva hasta la cuantificación cada vez más compleja de la naturaleza.

De la misma forma ha avanzado el estudio de las formas de los individuos: desde la morfometría tradicional hasta la moderna morfometría geométrica. La morfometría tradicional consiste en el manejo estadístico de dimensiones, es decir, longitudes, anchos y ángulos y la forma se analiza a través de la aplicación de análisis estadísticos clásicos. Sin embargo, algunas de las principales desventajas que presenta esta metodología son que las relaciones espaciales entre las variables se pierden durante el análisis estadístico, que las combinaciones lineales de medida ofrecen información de forma, pero también de tamaño, y que muchas medidas parten de un mismo punto, lo que hace que los valores no sean completamente independientes, por lo que un error que afecte un punto afectará a todas las medidas (Bookstein *et al.*, 1985; Adams *et al.*, 2004).

La morfometría geométrica puede ser considerada como el sistema de métodos y procedimientos, con base geométrica, para el análisis de los patrones de forma, donde las mediciones usualmente derivan de contornos y puntos morfológicos claves (Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004). Esta moderna técnica es ampliamente utilizada en numerosas ramas de las ciencias biológicas. La estricta cuantificación sólo de la forma de los organismos, o sus estructuras, ha permitido, por ejemplo, analizar variabilidad geográfica (Corti y Crosetti, 1996), variaciones ontogenéticas (Tomecek *et al.*, 2005), delimitar especies (Barluenga *et al.*, 2006), estimar diversidad y disparidad (Willmore *et al.*, 2006) y analizar la evolución de las especies asociada a variaciones ambientales (Park *et al.*, 2013).

La morfometría geométrica en poecílicos se ha utilizado mayormente en estudios sobre historia de vida. Las interrogantes más frecuentes han estado relacionadas a cómo el ambiente en hábitats extremos (Fontanier y Tobler, 2009; Tobler *et al.*, 2011) o la presión

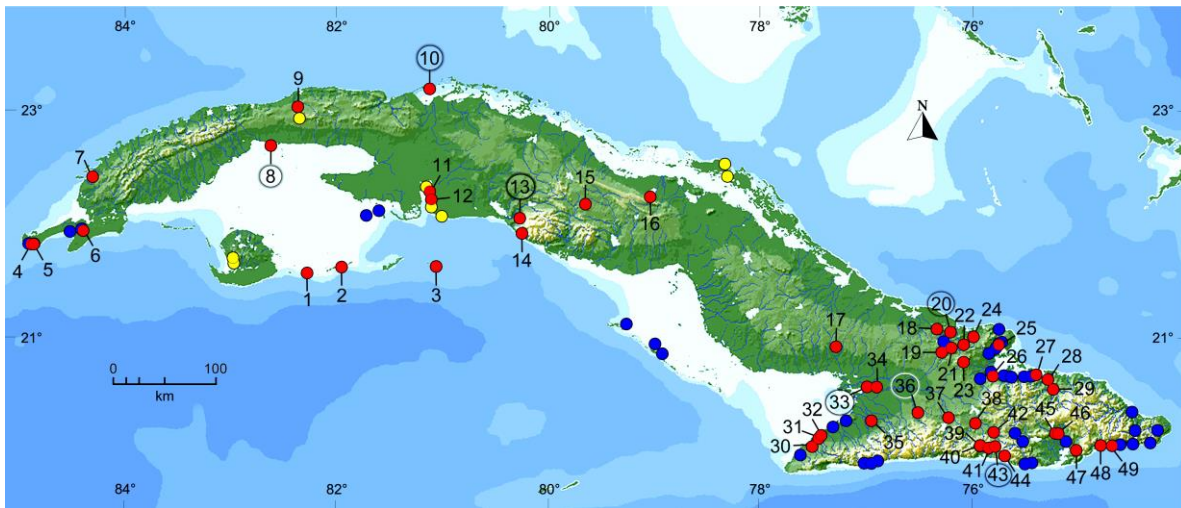
por depredadores (Langerhans y Makowicz, 2009; Hassell *et al.*, 2012; Ingley *et al.*, 2014) modulan las variaciones en la forma del cuerpo entre y dentro de las poblaciones. En Cuba, esta herramienta sólo se ha empleado para analizar cómo las diferencias ambientales en hábitats lénticos y lóticos han modulado la forma del cuerpo en *Gambusia puncticulata* (Cruz, 2014). Dadas las ventajas del uso de esta técnica en los diferentes campos de la ecología y la evolución y la poca información sobre la mayoría de las especies de peces de agua dulce de Cuba, la morfometría geométrica ofrece disímiles oportunidades para desarrollar esta rama de la ictiología en el país.



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Área de estudio y método de muestreo

Los peces se recolectaron en 49 acuatorios a lo largo del archipiélago cubano (Figura 1), incluyendo ríos, arroyos y lagunas salobres, saladas y de agua dulce (Anexo I). Para esto se usaron jamos o chinchorros (2x1m, paso de malla de 1mm) a aproximadamente 2 m de la orilla (Cote y Perrow, 2006). Luego fueron anestesiados con MS 222 (Metil-Sulfonato de Tricaína) y posteriormente preservados en etanol (90%) para el trabajo en el laboratorio.



**Figura 1.** Sitios de muestreo de *Limia vittata* en el archipiélago cubano. Rojo: localidades con *L. vittata*, azul: localidades sin *L. vittata*, amarillo: secuencias de COI en Lara *et al.* (2010). Los números circulados indican las localidades que fueron usadas para el análisis morfométrico.

Durante los muestreos se observó que la abundancia de *L. vittata* varía considerablemente entre poblaciones. Para el análisis molecular se incluyeron todos los acuatorios (1-9 individuos). Sin embargo, para el análisis morfométrico sólo se pudieron incluir siete

poblaciones (16-26 hembras y 18-24 machos): tres de la región occidental y cuatro de la región oriental (localidades circuladas en la Fig. 1).

## *II.2. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN*

El ADN total se extrajo de una sección del músculo de la región lateral derecha del pedúnculo caudal de los individuos de *L. vittata*. El tejido fue digerido en una solución tampón con SDS y proteasa K, seguido de extracciones sucesivas con fenol/cloroformo y precipitación con etanol (70%), según modificaciones a la metodología de Kocher *et al.* (1989).

El gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) y la región no codificadora (RNC) fueron amplificados a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en 20 µL de volumen final según el programa de ciclos: 94°C, 5 min; 35 ciclos, 94°C, 45 s; 48°C, 45 s; 72°C, 1 min y 30 s; y 72°C, 10 min. Se usaron los siguientes cebadores: COIf (5'-AAYCAYAAAGAYGGYACCCT-3'), COIr (3'-CCTCNGGRTGNCRAAGAAAYCA-5') (Palumbi *et al.*, 1991), CR-A (5'-AATTCTCACCCCTAgCTCCCAAAG-3') y CR-E (5'-CCTgAAgTAggAACCAgATg-3') (Meyer *et al.*, 1990). Los productos de la PCR fueron purificados con la enzima ExoSAP-IT™ PCR *Product Cleanup Reagent* según instrucciones del productor (Affymetrix Inc.) y posteriormente secuenciados con el kit ABIPrism Big Dye V.3 (PerkinElmer). Los fragmentos fueron resueltos con un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias se editaron y alinearon con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v5.0.9 (Hall, 1999).

### *II.3. Diversidad y estructura genética*

Se utilizó el programa DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009) para estimar la diversidad haplotípica ( $h$ , probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar sean diferentes) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ , media de las diferencias entre todos los pares de haplotipos).

La estructura poblacional se infirió con el uso del programa BAPS 5.2 (Corander *et al.*, 2003; Corander y Marttinen, 2006). Como única información *a priori* se incluyó la población origen de los individuos. Se usaron cinco réplicas para cada valor de  $k$  (número máximo de grupos) y se corrió el programa con  $k=5$ ,  $k=10$  y  $k=15$  según lo sugerido por los autores y lo encontrado en otros grupos de vertebrados en Cuba (Rodríguez *et al.*, 2010; Alonso *et al.*, 2012).

La identificación de haplotipos, realizada con el programa DnaSP 5.1.0 (Librado y Rozas, 2009), y la determinación de las relaciones entre los haplotipos se hicieron basadas en el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) implementado en el programa Network 5.0 (FluxusTechnology). Con este programa también se realizó un análisis *a posteriori* basado en máxima parsimonia para obtener las redes más parsimoniosas y reducir las ramas superfluas.

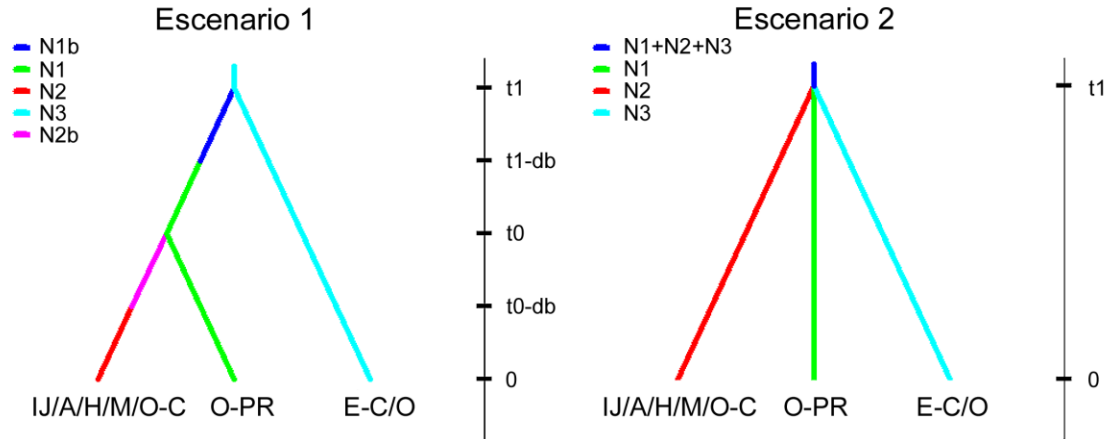
Para evaluar la existencia de aislamiento por distancia se realizaron pruebas de correlación de matrices (Mantel, 1967) en el programa PAST 3.0 (Hammer *et al.*, 2001) con 10 000 permutaciones. Se usaron los valores del índice de fijación  $\Phi_{ST}$  de Excoffier *et al.* (1992) entre pares de poblaciones, calculados en el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) y los valores de distancia geográfica mínima entre las localidades.

#### *II.4. Relaciones filogenéticas*

El análisis filogenético fue realizado para cada región del ADNmt analizada según el modelo de sustitución nucleotídica inferido con el programa PartitionFinder 1.1.0 (Lanfear *et al.*, 2012). Las relaciones filogenéticas se infirieron utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Los valores de gamma y los valores estacionarios de las frecuencias nucleotídicas fueron estimados directamente durante la inferencia. El valor de divergencia entre los clados identificados se estimó a partir de la distancia no corregida *p*. Ambos análisis se realizaron con el programa MEGA 7.0.18 (Kumar *et al.*, 2016). El grupo externo lo constituyó una secuencia de *Limia perugiae* (No. de acceso a GenBank KX024236.1).

#### *II.5. Prueba de escenarios de dispersión y vicarianza*

Para explicar el posible origen y distribución de *L. vittata* en Cuba se usó el método de Cálculo Bayesiano Aproximado (ABC; Beaumont *et al.*, 2002) con el programa DIYABC v2.0 (Cornuet *et al.*, 2008). De acuerdo con la estructura de la red de haplotipos y la hipótesis más reciente de evolución del género *Limia* (Weaver *et al.*, 2006), se plantearon dos escenarios (Fig. 2): 1- origen en la región oriental y progresiva dispersión hacia el Oeste (modelo de salto piedra a piedra, *stepping stone*) y 2- origen en una población que se fragmenta en tres grupos (modelo vicariante).



**Figura 2.** Pruebas de hipótesis bajo el método de Cálculo Bayesiano Aproximado para dilucidar los procesos involucrados en el patrón de distribución actual de *Limia vittata* basado en los genes COI y RNC. N1: tamaño efectivo poblacional del grupo Oeste de Pinar del Río (O-PR), N2: tamaño efectivo poblacional del grupo IJ/Habana/Artemisa/Matanzas/Oeste del Centro (IJ/H/A/M/O-C), N3: tamaño efectivo poblacional del grupo Este del Centro/Oriente (E-C/O), N1b: número efectivo de fundadores de O-PR luego de un evento de dispersión, N2b: número efectivo de fundadores de IJ/H/A/M/O-C luego de un evento de dispersión, db: duración del cuello de botella.

Para el establecimiento de los parámetros del modelo se asumió que: (1) el tamaño efectivo ( $N_i$ ) de la población ancestral permaneció constante en el tiempo, (2) cada población derivada fundadora transitó por un cuello de botella ( $db$ ) y representa una fracción de la población origen al momento del establecimiento y (3) el número efectivo de fundadores ( $N_{ib}$ ) permaneció pequeño por varias generaciones antes de expandirse. Los valores *a priori* de estos tres parámetros y del tiempo ( $t$ ) fueron considerados uniformes y fueron los siguientes:  $1\ 000 \leq N_i \leq 1\ 000\ 000$ ,  $1 \leq db \leq 10\ 000$ ,  $10 \leq N_{ib} \leq 10\ 000$  y  $10 \leq t \leq 100\ 000$ . Como parámetros a inferir en el análisis se usaron los siguientes estadísticos: número de haplotipos, número de sitios segregantes, media de distancias pareadas y el estadístico  $F_{ST}$  de Hudson *et al.* (1992). Se usaron 2 000 000 datos simulados para la tabla de referencia y

se estimó la probabilidad posterior de los dos escenarios según el método de regresión logística (Fagundes *et al.*, 2007).

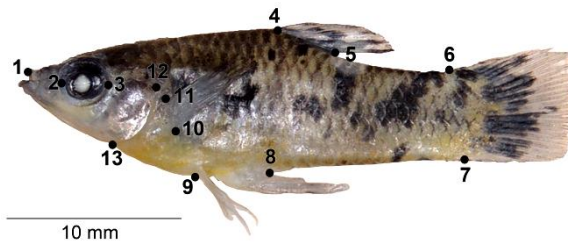
## *II.6. Demografía histórica*

El patrón de demografía histórica se analizó a partir de la distribución de las diferencias observadas y esperadas entre pares de haplotipos (*mismatch distribution*; Rogers y Harpending, 1992) con el programa DnaSP 5.10 (Librado y Rozas, 2009). En este sentido, poblaciones que han estado en equilibrio por mucho tiempo exhiben una distribución multimodal, mientras que poblaciones en expansión demográfica presentan una distribución unimodal (Rogers y Harpending, 1992). Se usó el método de suma de desviaciones cuadradas (SSD) (Schneider y Excoffier, 1999) para verificar el ajuste de la distribución observada a la esperada.

Adicionalmente se estimaron otros estadísticos que también son sensibles a fluctuaciones demográficas. Se calcularon las pruebas de neutralidad de Tajima (1989) ( $D$ ) y Fu (1997) ( $F_s$ ) con 10 000 simulaciones en el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) y se calculó el índice  $R^2$  propuesto por Ramos-Onsins y Rozas (2002) el programa DnaSP 5.10 (Librado y Rozas, 2009). En general, si la hipótesis de neutralidad es descartada es aceptado que valores no significativos para dichos estadísticos son típicos de poblaciones en equilibrio demográfico; que valores negativos y significativos de  $D$  y  $F_s$  indican expansión demográfica reciente; mientras que valores positivos significativos de  $D$  y  $F_s$  indican un cuello de botella reciente (Holsinger, 2012). Igualmente, elevados valores de  $R^2$  sugieren estabilidad demográfica y bajos valores sugieren expansión demográfica (Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

### II.7. Análisis morfométrico

El análisis de la forma del cuerpo se realizó mediante el método de morfometría geométrica basado en puntos claves. Sólo fueron analizados individuos adultos pues se ha probado que en poecílidos la forma del cuerpo varía durante la ontogenia (Hassell *et al.*, 2012). Se tomó una fotografía en vista lateral derecha de cada espécimen de *L. vittata* (Fig. 3) con una cámara Nikon Coolpix P510 sobre un trípode a una distancia focal de 20 cm. Para el análisis de las formas se escogieron 13 puntos claves: 1: extremo anterior de la premaxila, 2: margen anterior del ojo, 3: margen posterior del ojo, 4: inserción anterior de la aleta dorsal, 5: inserción posterior de la aleta dorsal, 6: inserción dorsal de la aleta caudal, 7: inserción ventral de la aleta caudal, 8: inserción posterior de la aleta anal (o gonopodio), 9: inserción anterior de la aleta pélvica, 10: inserción inferior de la aleta pectoral, 11: inserción superior de la aleta pectoral, 12: inserción dorsal de la apertura opercular, 13: inserción de la apertura opercular con la superficie ventral del cuerpo. Dichos puntos se digitalizaron a través del programa tpsDig 2.12 (Rohlf, 2008).



**Figura 3.** Vista lateral de un macho de *Limia vittata*. Los números representan los puntos claves incluidos en el análisis. 1: extremo anterior de la premaxila, 2: margen anterior del ojo, 3: margen posterior del ojo, 4: inserción anterior de la aleta dorsal, 5: inserción posterior de la aleta dorsal, 6: inserción dorsal de la aleta caudal, 7: inserción ventral de la aleta caudal, 8: inserción posterior de la aleta anal (gonopodio), 9: inserción anterior de la aleta pélvica, 10: inserción inferior de la aleta pectoral, 11: inserción superior de la aleta

pectoral, 12: inserción dorsal de la apertura opercular, 13: inserción ventral de la apertura opercular.

Las coordenadas originales fueron alineadas y transformadas en coordenadas de forma mediante el Análisis Procrustes Generalizado (GPA por sus siglas en inglés) (Rohlf, 1990) con el programa tpsRelw 1.45 (Rohlf, 2007). Con este programa también se obtuvieron las curvaturas parciales (*partial warps*) y relativas (*relative warps*), cuyos puntajes representan las nuevas variables de forma que se usan en los análisis estadísticos. Además, se calculó el tamaño del centroide (CS) y fue usado como indicador de la talla de los individuos (Marroig, 2007; Klingenberg, 2016).

#### *II.8. Análisis estadístico*

Los integrantes de la familia Poeciliidae tienen un marcado dimorfismo sexual (Rosen y Bailey, 1963). Por tal razón, se realizó un análisis linear discriminante para determinar el porcentaje de clasificación correcta de la forma del cuerpo de los individuos según el sexo (Baylac *et al.*, 2003). Para evaluar el dimorfismo sexual respecto a la forma del cuerpo en *L. vittata* se realizaron análisis de varianza por permutaciones (PERMANOVA por sus siglas en inglés) en el paquete estadístico PRIMER-E v6.1.16 (Clarke y Warwick, 2001) y PERMANOVA+ v1.0.6 (Anderson *et al.*, 2008). Las variables dependientes fueron las curvaturas parciales. Se realizó un análisis multivariado y multifactorial con los siguientes parámetros: factor Sexo (fijo, dos niveles), factor Grupo (fijo, dos niveles), factor Localidad (aleatorio, siete niveles, anidado en el factor Grupo), medida de similitud de Jaccard y 9999 permutaciones de los residuales bajo un modelo reducido. Además, para tener en cuenta el posible efecto de la talla en la forma del cuerpo se repitió este análisis tomando el tamaño del centroide como covariable.



Al analizar los sexos por separados las variables de forma fueron las curvaturas relativas. Para maximizar y visualizar la separación de los individuos entre cada localidad, independientemente de la región a que pertenece, se realizó un Análisis Canónico Variado en el programa PAST 3.0 (Hammer *et al.*, 2001). Para evaluar si el aislamiento genético y el aislamiento geográfico influyen en la diferenciación morfológica entre las poblaciones de *L. vittata* se realizaron pruebas de correlación de matrices. Se realizó la prueba de Mantel (Mantel, 1967) con 10 000 permutaciones en el programa PAST 3.0 (Hammer *et al.*, 2001). La distancia morfológica se calculó a partir de la distancia de Mahalanobis de las curvaturas relativas de los machos. Como medida de distancia genética se usó el índice de fijación  $\Phi_{ST}$  (Excoffier *et al.*, 1992) entre pares de localidades, calculado en el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). La distancia geográfica se calculó como la distancia mínima (km) entre las siete localidades muestreadas.

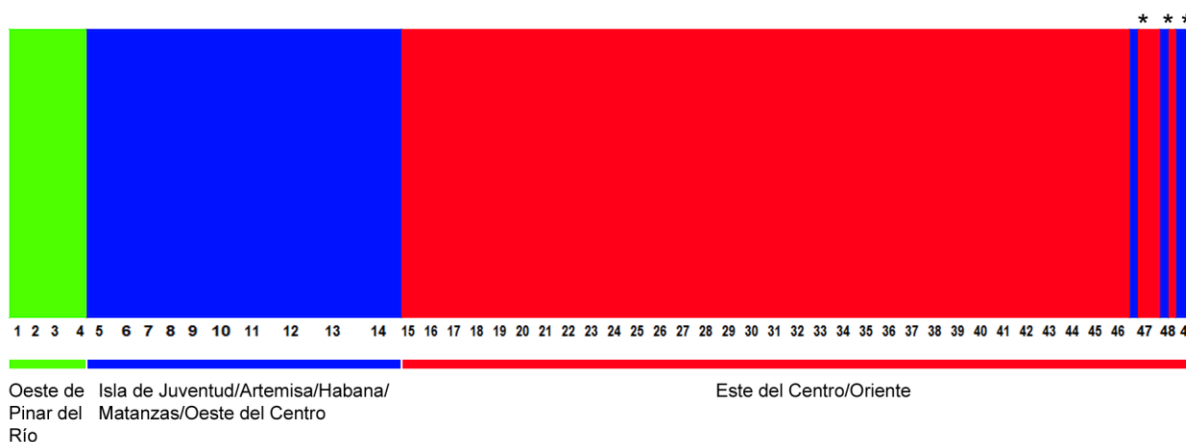
### III. RESULTADOS

#### III.1. Diversidad y estructura genética poblacional

En total se analizaron 1048 pares de bases, 628 de COI y 420 de la RNC provenientes de 150 individuos de *Limia vittata*. Se identificaron 56 haplotipos del fragmento secuenciado de COI, con una diversidad haplotípica de  $0,884 \pm 0,022$  y una diversidad nucleotídica de  $0,009 \pm 0,006$ . Para la RNC se identificaron 49 haplotipos, con una diversidad haplotípica de  $0,866 \pm 0,023$  y una diversidad nucleotídica de  $0,014 \pm 0,0008$ . Al analizar los genes concatenados se identificaron 89 haplotipos, con una diversidad haplotípica de  $0,965 \pm 0,010$  y una diversidad nucleotídica de  $0,0110 \pm 0,0007$ .

El análisis bayesiano de asignación (*BAPS* por su siglas en inglés) al incluir 155 individuos provenientes de las 49 localidades muestreadas detectó tres grupos genéticos (Fig. 4) con el máximo valor de probabilidad ( $p=1$ ). Los grupos identificados coinciden espacialmente con tres regiones geográficas de Cuba: (1) Oeste de Pinar del Río (O-PR), (2) Isla de la Juventud/Artemisa/La Habana/Matanzas y Oeste del Centro (IJ/H/A/M/O-C) y (3) Este del Centro y Oriente (E-C/O).

Los ríos Yateras (No. 47), Sabanalamar (No. 48) y Yacabo Abajo (No. 49), todos en la provincia Guantánamo, albergan poblaciones de individuos del grupo oriental (E-C/O) y del grupo que incluye la mayor parte de la región occidental (IJ/H/A/M/O-C) (asteriscos en la Fig. 4). Dichos individuos ( $n=5$ ) sólo fueron incluidos en el presente análisis y en la identificación de los haplotipos.



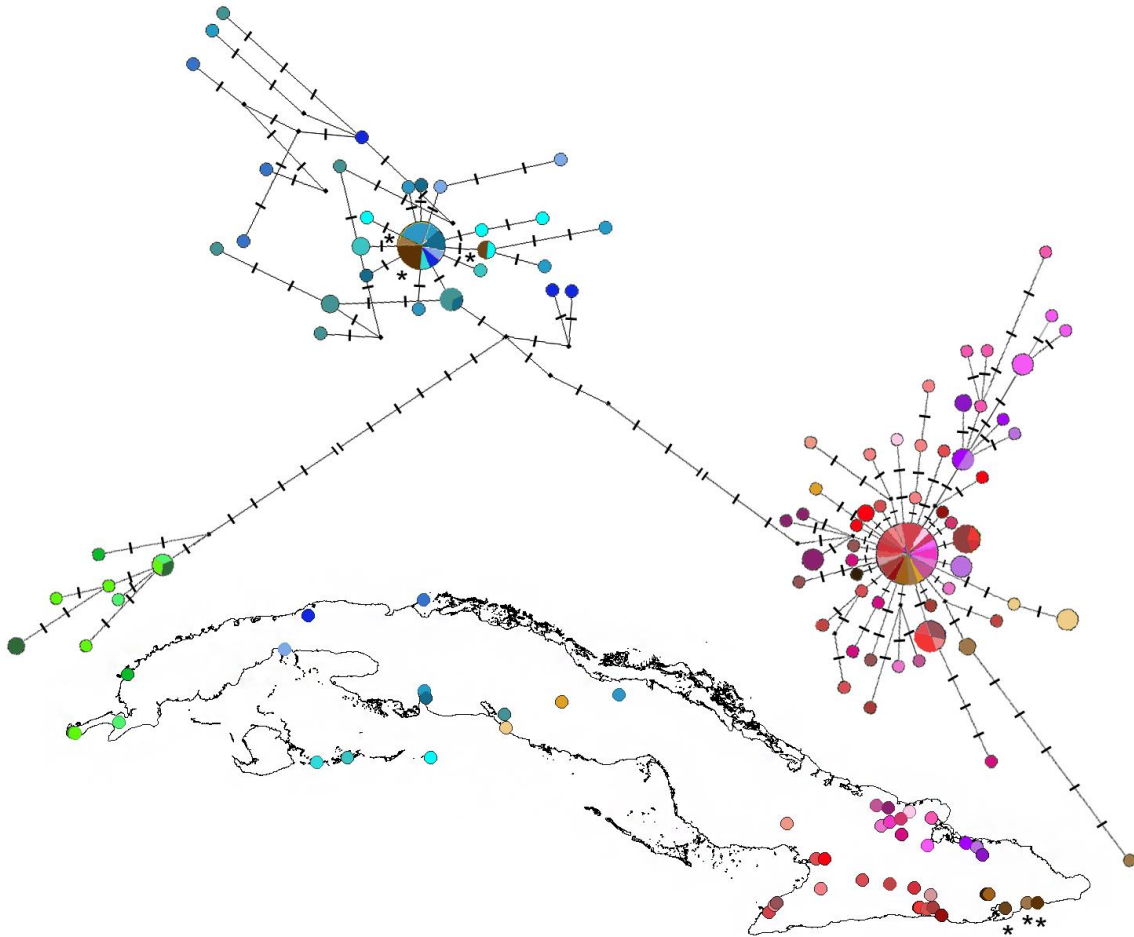
**Figura 4.** Análisis bayesiano de asignación basado en 1048 pares de bases de las secuencias de los genes mitocondriales COI y RNC que muestra tres grupos genéticos identificados ( $p=1$ ). Cada barra vertical representa un individuo. Los números se corresponden con las localidades en la Fig. 1 y en el Anexo I. \*localidades orientales con individuos del grupo de la región IJ/H/A/M/O-C.

La existencia de aislamiento por distancia sólo se encontró en el grupo IJ/A/H/M/O-C ( $R=0,404$ ;  $p=0,004$ ). En los grupos O-PR y E-C/O no se obtuvo evidencia del efecto de la distancia geográfica en la diferenciación de las poblaciones ( $R=0,710$ ;  $p=0,255$  y  $R=-0,078$ ;  $p=0,958$ , respectivamente).

### III.2. Relaciones entre haplotipos y relaciones entre grupos

La red de haplotipos fue muy similar con las secuencias de COI y RNC. En la Figura 5 se presenta la red de haplotipos obtenida con los genes concatenados, donde se observan tres haplogrupos bien definidos. Estos se corresponden con los tres grupos identificados en el análisis bayesiano de asignación. En general, se observa que los haplotipos son independientes para cada grupo. Igualmente, dentro de los grupos hay varios haplotipos con distribución restringida, como los de Los Canarreos (No. 2 y 3, azul claro) e Hicacos (No. 10, tonalidad intermedia de azul) en IJ/H/A/M/O-C y los de la mayor parte de

Holguín (tonalidades moradas y rosadas) en E-C/O. Además, es de notar que en la región central del país existe cierta superposición espacial de los linajes IJ/H/A/M/O-C y E-C/O sin encontrarse en condición de simpatria en ninguna localidad; a diferencia de lo encontrado en el Sur de la región oriental, particularmente en la provincia Guantánamo, donde se encontró el haplotipo más frecuente de la región IJ/H/A/M/O-C.



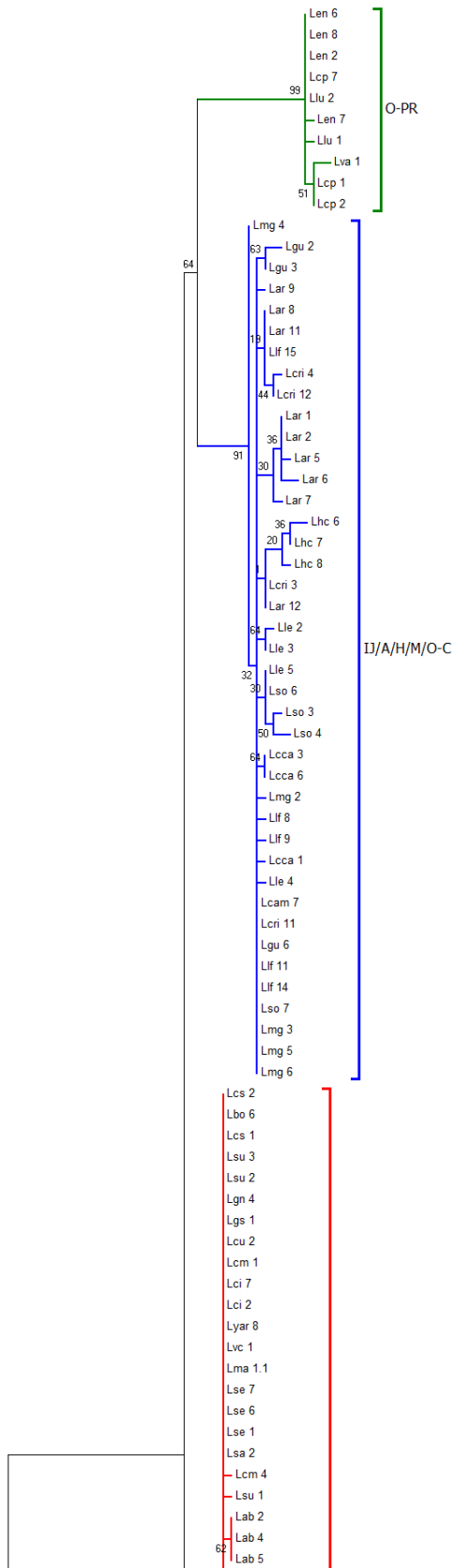
**Figura 5.** Red de haplotipos basada en el algoritmo *Median Joining* a partir de las secuencias de COI y RNC en *Limia vittata*. El tamaño de los círculos en la red es proporcional al número de haplotipos. Verde: haplogrupo Oeste de Pinar del Río, Azul: haplogrupo Isla de la Juventud/Artemisa/La Habana/Matanzas y Oeste del Centro, Rojo: haplogrupo Este del Centro y Oriente. \*localidades orientales con el haplotipo más frecuente de la región IJ/H/A/M/O-C.

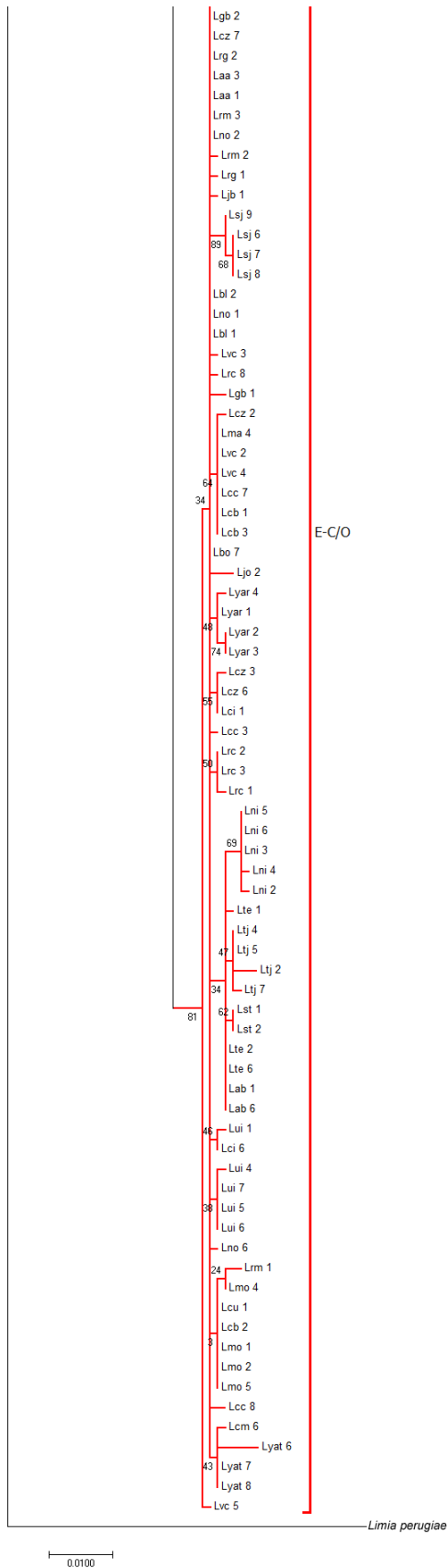
El haplotipo más común del grupo IJ/H/A/M/O-C estuvo compartido por pocos individuos (9/41), mientras que el haplotipo más común de E-C/O fue compartido por 25 de 99 individuos. Por otra parte, la alta diversidad haplotípica encontrada en *L. vittata* con las secuencias de COI y RNC también se observa al analizar los grupos geográficos por separado, independientemente del número de individuos en cada uno (Tabla I). Sin embargo, estos presentaron relativamente bajos valores de diversidad nucleotídica.

**Tabla I.** Diversidad genética de las poblaciones geográficas identificadas en *Limia vittata*. Número de individuos incluidos (n), número de haplotipos (H) y diversidad haplotípica ( $h \pm DE$ ) y nucleotídica ( $\pi \pm DE$ ).

| Haplogrupos  | n  | H  | $h \pm DE$        | $\pi \pm DE$       |
|--------------|----|----|-------------------|--------------------|
| O-PR         | 10 | 7  | $0,911 \pm 0,077$ | $0,003 \pm 0,0008$ |
| IJ/H/A/M/O-C | 41 | 29 | $0,950 \pm 0,026$ | $0,004 \pm 0,0005$ |
| E-C/O        | 99 | 53 | $0,929 \pm 0,021$ | $0,003 \pm 0,0003$ |

La Figura 6 muestra las relaciones filogenéticas entre los individuos de *L. vittata* a partir de los genes COI y RNC basadas en el modelo HKY+G+I. La divergencia genética intraespecífica promedio (COI+RNC) fue de  $0,011 \pm 0,002$ . Los principales clados coinciden, como esperado, con los tres haplogrupos previamente identificados. Las subregiones occidentales (O-PR e IJ/A/H/M/O-C) comparten un ancestro común más reciente a exclusión de la subregión oriental. Al analizar los valores de distancia genética (distancia no corregida  $p$ ), se observa que fueron relativamente altos y similares entre las unidades identificadas, tanto con los genes concatenados como analizados por separado (Tabla II).





**Figura 6.** Árbol filogenético que representa las relaciones entre los individuos de *Limia vittata* por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo HKY+G+I y secuencias de los genes concatenados COI y RNC. En las ramas se muestran los valores de *bootstrap*.

**Tabla II.** Divergencia genética basada en la distancia no corregida  $p$  entre los haplogrupos de *Limia vittata* a partir de las secuencias de COI y RNC. Valores de desviación estándar por encima de la diagonal.

| Haplogrupos    | COI+RNC |       |       | COI   |       |       | RNC   |       |       |
|----------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                | 1       | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     |
| 1. O-PR        |         | 0,004 | 0,004 |       | 0,005 | 0,005 |       | 0,007 | 0,007 |
| 2. IJ/A/H/MO-C | 0,022   |       | 0,003 | 0,020 |       | 0,004 | 0,025 |       | 0,007 |
| 3. E-C/O       | 0,023   | 0,017 |       | 0,019 | 0,013 |       | 0,028 | 0,024 |       |

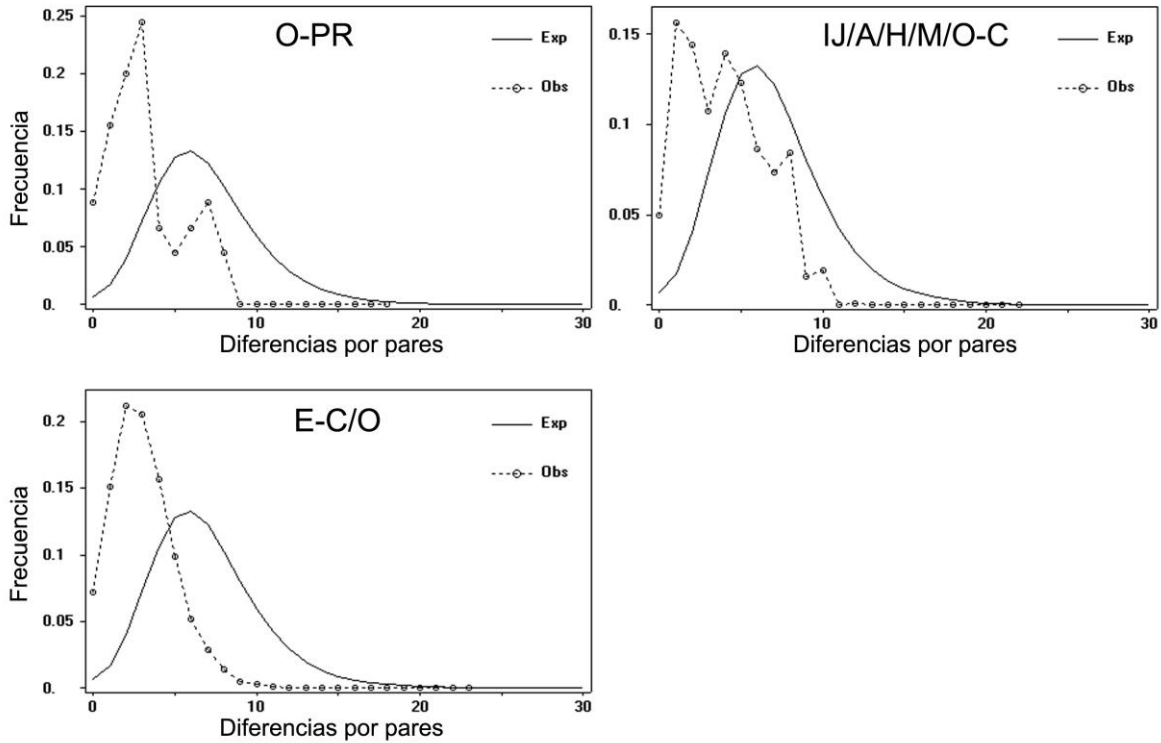
### III.3. Prueba de escenarios de dispersión y vicarianza

El modelo de evolución salto piedra a piedra, que involucra la dispersión progresiva del Este hacia el Oeste (escenario 1) (Fig. 2) es el que mejor explica la distribución actual de *L. vittata*, con una probabilidad media de 0,9818 (0,9790 - 0,9847).

### III.4. Demografía histórica

La Figura 7 muestra la distribución de las diferencias por pares de haplotipos de los tres haplogrupos identificados en *L. vittata*. Los grupos occidentales, es decir, O-PR e IJ/H/A/M/O-C, muestran una distribución multimodal pero la prueba de bondad de ajuste SSD fue baja y no significativa, que indica que ambos no se desvían totalmente de un patrón esperado bajo expansión poblacional. El grupo oriental, E-C/O muestra una distribución unimodal, también con valores de SSD bajos y no significativos, que sugiere expansión poblacional.





**Figura 7.** Distribución de las diferencias por pares de haplotipos (*mismatch distribution*) de *Limia vittata* basado en las secuencias de COI y RNC. Línea discontinua: distribución de las diferencias pareadas observadas, línea continua: valores esperados bajo un modelo de crecimiento o decline poblacional. O-PR: Oeste de Pinar del Río, IJ/H/A/M/O-C: Isla de la Juventud/Artemisa/La Habana/Matanzas y E-C/O: Este del Centro y Oriente.

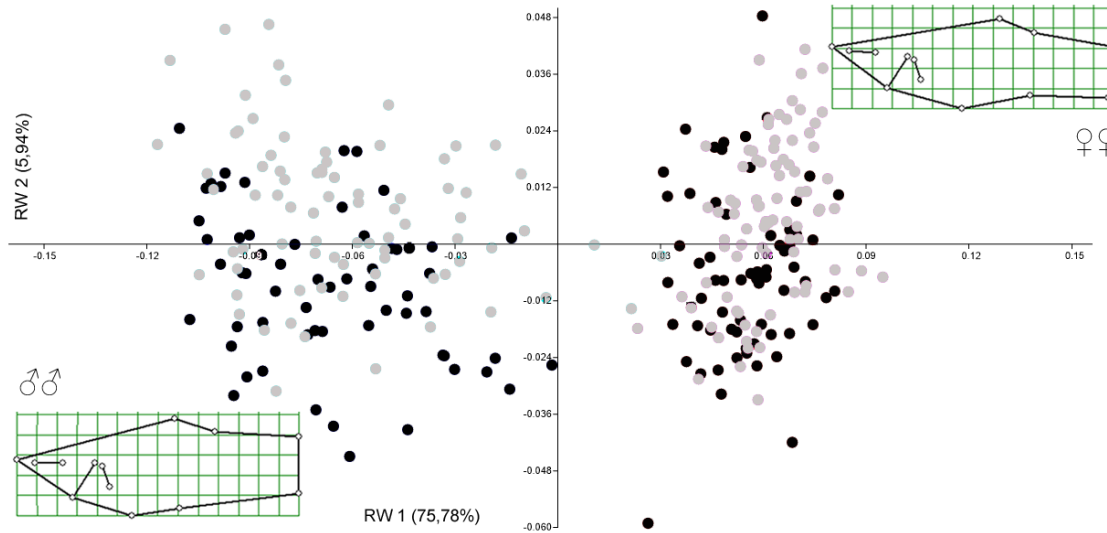
Los parámetros demográficos de los tres haplogrupos se resumen en la Tabla III. Los estadísticos  $D$  y  $F_s$  de los haplogrupos IJ/H/A/M/O-C y E-C/O fueron negativos y significativos, y el índice  $R^2$  fue muy bajo, lo que confirma un proceso de expansión poblacional. Por el contrario, los valores de dichos estadísticos fueron no significativos y  $R^2$  fue relativamente alto para el grupo O-PR, lo que indica estabilidad demográfica.

**Tabla III.** Parámetros demográficos de los tres haplogrupos en *Lima vittata*. O-PR: Oeste de Pinar del Río, IJ/H/A/M/O-C: Isla de la Juventud/Artemisa/La Habana/Matanzas y E-C/O: Este del Centro y Oriente. NS: no significativo, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

| Haplogrupo   | n  | SSD       | D         | F <sub>s</sub> | R <sup>2</sup> |
|--------------|----|-----------|-----------|----------------|----------------|
| O-PR         | 10 | 0,0177 NS | -1,157 NS | -1,910 NS      | 0,138          |
| IJ/H/A/M/O-C | 41 | 0,0034 NS | -1,624 *  | -24,437 **     | 0,054          |
| E-C/O        | 99 | 0,0005 NS | -2,362 ** | -26,161 **     | 0,024          |

### III.5. Variabilidad en la forma del cuerpo

El dimorfismo sexual en cuanto a la forma del cuerpo se evidencia en el análisis de curvaturas relativas (Fig. 8). Las dos primeras curvaturas acumularon el 81% de la variación total. Las rejillas de deformación de la forma consenso en cada sexo muestran que las principales diferencias entre hembras y machos están en la región ventral del cuerpo, específicamente entre la aleta anal y las aletas pélvicas. Además, se aprecia que el pedúnculo caudal es ligeramente más ancho en los machos. El análisis lineal discriminante mostró que el 99% de los individuos pudieron ser clasificados según el sexo. Sin embargo, no se observan diferencias en la forma del cuerpo de cada sexo entre las regiones IJ/A/H/M/O-C (puntos en negro) y E-C/O (puntos en gris).



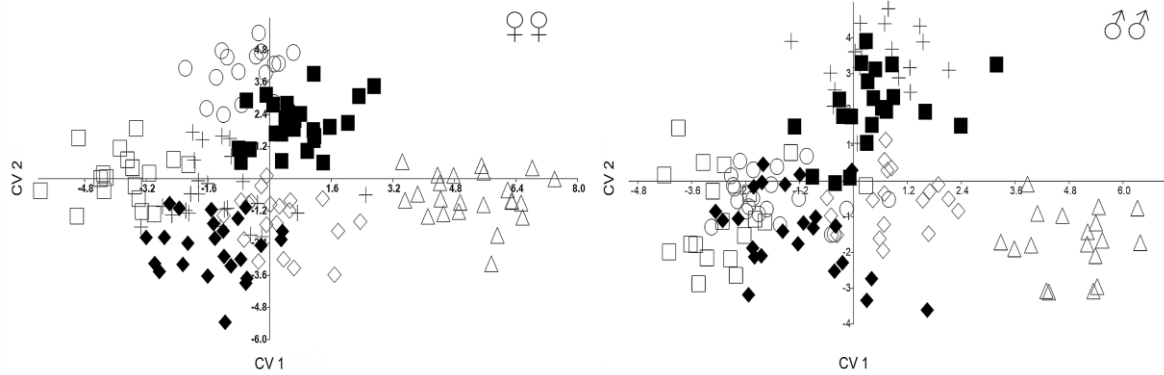
**Figura 8.** Análisis de curvaturas relativas (RW) en *Limia vittata* donde se muestra que las dos primeras abarcan el 81,72% de la variación. Izquierda: machos, Derecha: hembras, Negro: región IJ/A/H/M/O-C, Gris: E-C/O. Las rejillas de deformación representan la forma consenso de cada sexo.

La forma del cuerpo en *L. vittata* varió significativamente entre hembras y machos, entre localidades y en la interacción entre ambos factores (Sexo x Localidad) (Tabla IVa). Estos resultados fueron similares cuando se eliminó el efecto de la talla en la forma del cuerpo (Tabla IVb). Como esperado según el análisis de RW, no se encontraron diferencias significativas entre las regiones geográficas IJ/A/H/M/O-C y E-C/O.

**Tabla IV.** Resultados del análisis multivariado de varianza a) y covarianza b) por permutaciones (PERMANOVA) de la forma del cuerpo entre sexos, regiones y localidades. El tamaño del centroide (CS) fue transformado a raíz cuarta para reducir la dispersión de los datos. \* significación estadística con  $\alpha = 0,05$ .

| <b>Fuente</b>             | <b>gl</b> | <b>SC</b> | <b>Pseudo-F</b> | <b>p (perm)</b> |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|
| a) Sexo                   | 1         | 1,64E+05  | 46,61           | 0,0011*         |
| Región                    | 1         | 19759     | 1,46            | 0,1816          |
| Localidad (Región)        | 5         | 67788     | 12,98           | 0,0001*         |
| Sexo x Región             | 1         | 6452      | 1,84            | 0,1499          |
| Sexo x Localidad (Región) | 5         | 17629     | 3,37            | 0,0001*         |
| b) CS                     | 1         | 55080     | 7,57            | 0,0001*         |
| Sexo                      | 1         | 1,33E+05  | 23,81           | 0,0001*         |
| Región                    | 1         | 18769     | 1,42            | 0,2884          |
| Localidad (Región)        | 5         | 57252     | 11,03           | 0,0001*         |
| Sexo x Región             | 1         | 7245      | 2,05            | 0,1169          |
| Sexo x Localidad (Región) | 5         | 18058     | 3,48            | 0,0001*         |

La Figura 9 muestra la distribución de los individuos agrupados por localidades según la forma del cuerpo. En ambos sexos no se observa el patrón de agrupamiento encontrado previamente con los datos genéticos ni un patrón geográfico evidente. Sin embargo, se observan diferencias claras entre localidades, que en la mayoría de los casos, son coherentes entre machos y hembras. Estos son los casos de las localidades Hicacos (cuadrado negro) y Camaronera del Cauto (triángulo), que muestran individuos muy similares entre sí y diferentes respecto a las otras localidades.



**Figura 9.** Análisis canónico variado a partir de las curvaturas relativas en hembras (izquierda) y machos (derecha) de *L. vittata*. Región II/A/H/MO-C: Guanímar (cruz), Hicacos (cuadrado negro) y Río Arimao (círculo); Región E-C/O: Cacoyugúin (rombo negro), Camaronera del Cauto (triángulo), Cautillo (cuadrado blanco) y San Juan (rombo blanco). Los dos primeros ejes acumulan el 69,05% de la variación en las hembras y el 67,64% de la variación en los machos.

La divergencia genética a partir de las secuencias de COI+RNC entre las siete poblaciones de *L. vittata* muestreadas se correlacionó con las variaciones en la forma del cuerpo de los machos ( $R=0,403$ ;  $p=0,017$ ). Por el contrario, la diferenciación morfológica en las hembras ( $R=0,108$ ;  $p=0,217$ ) y los machos ( $R= -0,014$ ;  $p=0,692$ ) entre las diferentes poblaciones no parece estar relacionado con el aislamiento geográfico.

## IV. DISCUSIÓN

Esta investigación es la primera en analizar la variabilidad molecular intraespecífica en un representante del género *Limia*. Los resultados de este trabajo demuestran que la especie cubana, *L. vittata*, está formada por poblaciones geográficamente estructuradas, que al parecer han estado aisladas por un largo período de tiempo. El patrón geográfico identificado coincide parcialmente con lo encontrado en otros vertebrados en Cuba (Rodríguez *et al.*, 2010; Alonso *et al.*, 2012; Ponce de León *et al.*, 2014), lo que evidencia la influencia de eventos geológicos históricos en la evolución de la fauna de la Isla (Iturralde-Vinent, 2003; 2006). El aislamiento físico entre las poblaciones, dado por la discontinuidad espacial intrínseca de los ecosistemas de agua dulce (April *et al.*, 2011), parece haber reforzado el efecto de dichos procesos históricos en la diferenciación intraespecífica de *L. vittata*.

### IV.1. Diferenciación intraespecífica

La especiación alopátrica es considerada una de las causas más importantes de diversificación en peces de agua dulce (Hugueny, 1989; Perdices *et al.*, 2005; April *et al.*, 2011). En particular, en la familia Poeciliidae esta parece ser la causa principal (Hrbek *et al.*, 2007). Recientes estudios filogeográficos en Cuba han permitido apoyar dicha afirmación. El patrón de divergencia interespecífica dentro de los complejos de especies *Gambusia puncticulata* (Lemus, 2013) y *G. punctata* (Gutiérrez, 2016), en algunas especies del género *Girardinus* (Doadrio *et al.*, 2009), así como en géneros de otras familias (*e.g.*, *Rivulus* spp., Rivulidae) (Ponce de León *et al.*, 2014) son fuerte evidencia de lo antes expuesto.

En el pez ciego *Lucifuga dentata* (Familia Bythitidae) fue donde primero se realizó un análisis más profundo sobre el efecto del aislamiento geográfico a nivel intraespecífico en Cuba (Hernández *et al.*, 2016). Aparentemente, el aislamiento entre las poblaciones, impuesto fundamentalmente por la distribución de los ecosistemas subterráneos tuvo un papel crucial. Ya cuando las especies tienen un rango de distribución más amplio y existe una mayor interconexión entre los ecosistemas que habitan, pueden haber otros mecanismos evolutivos y factores que determinen su diferenciación intraespecífica (Koblmüller *et al.*, 2015; Bruno *et al.*, 2016).

En el caso de *L. vittata*, que tiene amplia distribución en Cuba, el patrón de diferenciación identificado es alopátrico y muestra una alta divergencia intraespecífica (COI; 0,90%). De hecho, es superior respecto a valores medios de varias especies de peces de Australia (0,39%, Ward *et al.*, 2005), Canadá (0,27%, Hubert *et al.*, 2008) y Estados Unidos (0,73%, April *et al.*, 2011). También es superior a valores medios respecto a 17 especies cubanas de peces de agua, cuyo rango estuvo entre 0,2 y 2,3% (valor medio: 0,6%, Lara *et al.*, 2010).

En *L. vittata* se identificaron tres grupos genéticos discretos: (1) Oeste de Pinar del Río (O-PR), (2) Isla de la Juventud/Artemisa/La Habana/Matanzas y Oeste del Centro (IJ/H/A/M/O-C) y (3) Este del Centro y Oriente (E-C/O), los cuales coinciden con tres regiones geográficas de Cuba, respectivamente. Los valores de divergencia (COI, distancia no corregida *p*) en cada uno fueron bajos: 0,002 ( $\pm 0,001$ ) en O-PR y 0,003 ( $\pm 0,001$ ) en IJ/H/A/M/O-C y E-C/O. Sin embargo, la mayoría de los valores de divergencia entre ellos estuvieron cerca del valor de corte propuesto para la divergencia entre especies congénicas de peces de agua dulce (2-3%, Hubert *et al.*, 2008). Estos valores indican un limitado flujo de genes entre los tres grupos, probablemente relacionado con el aislamiento

geográfico. Resultados similares se han encontrado entre grupos de poblaciones alopátricas con el gen citocromo b en *Rivulus cylindraceus* (Ponce de León *et al.*, 2014) y *Lucifuga dentata* (Hernández *et al.*, 2016).

La ausencia de haplotipos compartidos entre O-PR, IJ/H/A/M/O-C y E-C/O también evidencia la ausencia de flujo genético entre ellos. Sin embargo, la estructura de la red de haplotipos dentro de cada grupo indica tanto conexiones geográficas pasadas como un limitado flujo de genes entre poblaciones aisladas físicamente. Por ejemplo, la región centro-oriental, abarca una mayor extensión y una mayor densidad de acuatorios respecto a las regiones occidentales. Además, incluye la cuenca del río Cauto, que por ser el más largo de Cuba, conecta gran parte de los ecosistemas dulceacuícolas de la región oriental. Es posible que la combinación de estos factores justifique que el haplotipo más común de la región incluya poblaciones tan distantes como Arroyo Cabrales (No. 15 en la Figura 1) en Villa Clara, los ríos Mano (No. 18) y Almirante (No. 21) en Holguín y los ríos Bano (No. 46) y Sabanalamar (No. 48) en Guantánamo. No obstante, parece que existen otras condiciones determinando que ríos hoy físicamente cercanos y que forman parte de la cuenca del Cauto (No. 32-35) contengan haplotipos únicos.

Adicionalmente, la distribución de los haplotipos entre las poblaciones en la región nororiental y la suroriental pudieran indicar el efecto de un parteaguas en el centro de la Isla. El relieve actual y la configuración larga y estrecha de Cuba determinan la existencia de un parteaguas principal en el centro y a lo largo del país. Esto hace que el archipiélago quede dividido en dos vertientes, la norte y la sur (Valdés, 2000). La mayoría de los individuos en Holguín tienen haplotipos únicos y forman un clado bien definido, lo cual pudiera indicar el aislamiento de estas poblaciones por el efecto del parteaguas. La mayoría



de los ríos de Holguín fluyen hacia el Norte, mientras que los del resto de oriente fluyen hacia el Oeste o hacia el Sur.

El grupo IJ/H/A/M/O-C también incluye poblaciones muy distantes, pero separadas por mar y por grandes masas de tierra. Siguiendo una diferenciación de aislamiento por distancia, la influencia de estas barreras a la dispersión se observa fundamentalmente en las poblaciones de los Canarreos (No. 1, 2 y 3, Fig. 1) y la población en la península de Hicacos (No. 10). Estas presentan haplotipos únicos, excepto por la población de Cayo Campo (No. 1), lo que sugiere que aunque esta área estuvo conectada hasta hace relativamente poco tiempo (Iturralde-Vinent, 2003), la separación ha sido suficiente para que las poblaciones se diferenciaron. Por el contrario, el haplotipo más común de la región está formado por individuos de río Cristal (No. 9), la ciénaga de Zapata (No. 11 y 12) y Mayajigua (No. 16). Esto indica que el aislamiento geográfico de estas zonas es más reciente, de forma que hubo flujo genético en estas poblaciones hasta poco tiempo.

#### *IV.2. Dispersión vs fragmentación*

La dispersión por mar y la vicarianza han sido las principales hipótesis para explicar el origen de la biota de Las Antillas (Rosen y Bailey, 1963; Briggs, 1984; 1987; Rosen, 1976, 1985; Weaver *et al.*, 2016). Esta última fue la más aceptada por mucho tiempo y actualmente explica los patrones de divergencia de numerosas especies (Glor *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2012; Reznick *et al.*, 2017). No obstante, con mayor frecuencia estudios moleculares apoyan el papel decisivo de la dispersión por mar en la colonización de Las Antillas y otras zonas del Caribe (Glor *et al.*, 2005; Echelle *et al.*, 2006; Crews y Gillespie, 2010).

En el caso de los peces de agua dulce, la amplia tolerancia a la salinidad que tienen muchas de las especies en esta región (Burgess y Franz, 1989; Myers, 1938), debió favorecer la dispersión oceánica entre islas cercanas geográficamente y a través de cuencas dentro de las islas (Covich 2006; Cook *et al.* 2009). En este sentido, los niveles de divergencia de ADNmt en peces de amplia tolerancia a la salinidad, como muchas de las especies de los géneros *Gambusia* (Lydeard *et al.*, 1995b), *Limia* (Weaver *et al.*, 2016) y *Cyprinodon* (Echelle *et al.*, 2006), sugieren que grandes extensiones de mar no parecen haber actuado como barreras de larga distancia para la dispersión entre poblaciones alejadas geográficamente (Echelle *et al.*, 2006).

En Cuba, muchas de las especies de agua dulce también pueden ser encontradas en ecosistemas de agua salobre y salada (Vergara, 1992). Por esta razón, es probable que la dispersión de este tipo de especies no estuviera limitada a los períodos geológicos cuando bajaba el nivel del mar. Un ejemplo de esto se obtiene al analizar la evolución de *L. vittata*.

*Limia vittata* puede ser encontrada en la mayoría de los acuatorios de zonas bajas de Cuba y presenta una amplia tolerancia a la salinidad. De hecho, se ha observado en manglares y otros ecosistemas donde la salinidad alcanza *ca.* 45 UPS (J. L. Ponce de León, comunicación personal). Además, tiene una baja divergencia genética respecto a la alta diversidad críptica de otros peces de agua dulce de Cuba (Lara *et al.*, 2010). Todas estas razones sugieren que *L. vittata* debió quedar restringida a la región oriental y en tiempos relativamente recientes se haya dispersado hacia occidente, coincidiendo con momentos de interconexión entre las islas que constituyeron a Cuba (Iturralde-Vinent, 2003, 2006), probablemente antes y durante las fluctuaciones glaciales del Pleistoceno (Echelle *et al.*, 2006; Haney *et al.*, 2007).

Basado en la estructura de la red de haplotipos y en que sus ancestros probablemente arribaron desde el Este de Cuba, es decir, desde La Española (Weaver *et al.*, 2016), en este trabajo se probaron dos hipótesis para explicar la colonización y la distribución de la especie. En un escenario (1) los ancestros de *L. vittata* llegaron a Cuba y se dispersaron desde la región oriental hacia la occidental de manera progresiva, mientras que en el otro escenario (2) los ancestros de *L. vittata* colonizaron la Isla y se presentaban como una población única que se fragmentó debido a múltiples eventos geológicos y cambios ambientales ocurridos durante ese tiempo. De acuerdo con los resultados del análisis de Cálculo Bayesiano Aproximado, el escenario más probable es que la evolución de esta especie siguiera un modelo de salto piedra a piedra (escenario 1). Este modelo implica que los niveles de divergencia sean menores entre los grupos más cercanos geográficamente. En este trabajo se cuantificó que el grupo E-C/O está más relacionado con el grupo IJ/A/H/M/E-C que con el grupo O-PR, aunque los valores son similares. Esto sugiere que el proceso de dispersión hacia otros territorios debe haber ocurrido de manera relativamente rápida en el tiempo.

El criterio más aceptado sobre la separación de Cuba y La Española (Paso de Los Vientos) es que ocurrió hace aproximadamente 17-14 Ma (Iturralde-Vinent, 2006; Doadrio *et al.*, 2009; Weaver *et al.*, 2016; Reznick *et al.*, 2017). Posteriormente, ocurrió un proceso de especiación que resultó en *L. vittata* y *L. caymanensis* (3,64 Ma; Weaver *et al.*, 2016). En este período, las principales masas de tierra de la región central y oriental del país estaban conectadas por zonas bajas que temporalmente quedaban inundadas. La región occidental quedó parcialmente unida al resto luego del cierre del Canal Habana-Matanzas (6-5 Ma; Iturralde-Vinent, 2003), tal vez como consecuencia de una glaciación *ca.* 2,4 Ma (Haq *et*

al., 1987). En resumen, el Plioceno se caracterizó por el levantamiento general del terreno en el Caribe, a la vez que las partes bajas del relieve fueron sucesivamente inundadas y desecadas, como consecuencia de los movimientos neotectónicos y del nivel del mar (Iturralde-Vinent, 2003). Estas condiciones debieron ser propicias para que *L. vittata* se dispersara y colonizara la mayor parte de Cuba.

De acuerdo con la estructura genética identificada y el tiempo estimado al cierre el Canal Habana-Matanzas, ya *L. vittata* debía haber llegado hasta la región central. De esta forma, al bajar el nivel del mar, producto de dicha glaciación, durante los miles de años siguientes la especie colonizaría la mayor parte del occidente de Cuba. Sin embargo, la alternancia de períodos glaciales e interglaciales típico del Pleistoceno (Iturralde-Vinent, 2005), probablemente contribuyó a acentuar la diferenciación de *L. vittata* hasta conformar la estructura genética poblacional que se observa hoy, a la vez que favoreció la colonización de nuevas zonas, como la ciénaga de Zapata hace *ca.* 20 000 años (20 ka). En general, esto sugiere que, como se verá posteriormente, no siempre debe haber un terreno que sirva de puente, pues en los peces que toleran el agua salada las posibilidades de dispersarse fortuitamente son muy altas.

En este período hubo dos momentos claves para la colonización y diferenciación de la biota en Cuba. El primero de estos fue el interglacial del Pleistoceno Superior (130-120 ka). Este evento provocó el aumento del nivel del mar algunos metros por encima del nivel actual, lo que probablemente causó la extinción de gran parte de la fauna terrestre o que quedara aislada a zonas altas (Iturralde-Vinent, 2003). Sin embargo, para la fauna tolerante a la salinidad o que pudo adaptarse a estas condiciones, las llanuras periódicamente inundadas (ciénagas y ríos temporales con causes ramificados e inestables; Dzulyński *et*

*al.*, 1994) que formaban la mayor parte de Cuba, debieron funcionar como corredores que conectaron las principales masas de tierra emergidas. En particular, muchos peces de agua dulce debieron dispersarse cortas distancias a través de estas llanuras inundadas.

Por el contrario, en el último máximo glacial (25-20 ka) el nivel del mar disminuyó *ca.* 120 m respecto al nivel actual. Esto conectó la mayor parte de Cuba, situación que se mantuvo durante varios miles de años, lo que permitió un amplio intercambio de la biota terrestre. Esta glaciación también ha explicado la colonización de diferentes regiones del Caribe por varias especies de poecílidos. Por ejemplo, Echelle *et al.* (2006) sugirieron que los bajos valores de divergencia entre poblaciones de *Cyprinodon* en La Española y en Islas Caimán se deben a la conexión de áreas distantes geográficamente por la disminución del nivel mar. Sin embargo, probar esta idea es un poco difícil debido a la falta de evidencia geológica de conexión entre ambas áreas. Igualmente, Haney *et al.* (2007) comentaron que esta glaciación facilitó la dispersión de *Cyprinodon variegatus* desde el Sur de los cayos de la Florida hasta Andros, en Bahamas; lo cual se justificaría porque ambas zonas forman parte de la misma plataforma. Para algunas especies continentales esta glaciación no sólo favoreció la colonización de nuevas regiones (Galván-Quesada *et al.*, 2016), sino que es la principal causa de la falta de estructura poblacional en otras especies (Bruno *et al.*, 2016).

El patrón biogeográfico encontrado en *L. vittata* es similar al encontrado en otros vertebrados en Cuba. Este es el caso de los complejos de especies *Gambusia puncticulata* (Lemus, 2013) y *G. punctata* (Gutiérrez, 2016), de las ranas del grupo *Eleutherodactylus auriculatus* (Rodríguez *et al.*, 2010) y algunos sapos del género *Peltophryne* (Alonso *et al.*, 2012). Las principales diferencias entre estos grupos respecto al área y límites de ocupación y divergencia intra e interespecífica pudieran estar relacionados con el tiempo

que se estima que llevan evolucionando en la Isla (Alonso *et al.*, 2012; Reznick *et al.*, 2017) y la adaptación a diferentes factores como la salinidad, la altitud y la competencia interespecífica.

Los tres grupos identificados en *L. vittata* se encuentran a nivel intraespecífico, mientras que en la mayoría de los vertebrados mencionados dichos grupos geográficos se corresponden con linajes independientes. Otra diferencia es el uso de las principales regiones montañosas de Cuba como posibles áreas de refugio. Esto resultó en la especiación de linajes adicionales: tres en *E. auriculatus* y dos en *G. puncticulata* en el macizo Nipe-Sagua-Baracoa (Rodríguez *et al.*, 2010 y Lemus, 2013, respectivamente) y uno en *G. punctata* en el macizo de Guamuhaia (Gutiérrez, 2016). A menor escala, los grupos O-PR e IJ/A/H/M/O-C coinciden con los linajes independientes del género *Rivulus* en Cuba (Ponce de León *et al.*, 2014). En este caso, la cordillera de Guaniguanico también funcionó como área de refugio, donde evolucionó *R. berovidesi*, mientras que en la Isla de la Juventud, el Sur de Artemisa y la ciénaga de Zapata evolucionó *R. cylindraceus*.

Desde un punto de vista geológico, las Antillas Mayores ha sido una región muy inestable. De hecho, la configuración actual de la mayoría de las islas ha dependido de movimientos de ascenso del terreno, con una mayor tasa de velocidad en comparación con las oscilaciones del nivel mar desde los últimos tres millones de años (Iturralde-Vinent, 2005). Los resultados aquí presentados, así como su similitud con los descritos en otras investigaciones en el país, sugieren que el patrón de divergencia intra e interespecífico evidencia cómo eventos geológicos históricos han moldeado la evolución de los vertebrados en Cuba.

### IV.3. Diversidad genética y demografía

Aunque la familia Poeciliidae es una de las más diversas en América y es ampliamente usada como modelo biológico en numerosas investigaciones (Evans *et al.*, 2011; Pollux *et al.*, 2014; Reznick *et al.*, 2017), la diversidad genética en poblaciones naturales ha sido poco abordada. En particular, dentro del género *Limia*, las secuencias disponibles en GenBank provenientes de Weaver *et al.* (2016) con cuatro genes mitocondriales (RNC, *cytb*, ND2 y 12S) no son suficientes para un análisis intraespecífico o muestran una diversidad haplotípica y nucleotídica igual a cero. Esto dificulta hacer comparaciones de la diversidad genética entre *L. vittata* y alguno de sus congéneres.

En general, el patrón de diversidad genética encontrado en *L. vittata* sugiere expansión demográfica. Esto probablemente esté relacionado con eventos de reducción poblacional asociados a la reducción de los territorios durante las glaciaciones. Al analizar los grupos de poblaciones por separado esta tendencia es más evidente. En estos se observa que tanto los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica como las pruebas de neutralidad, indican expansión poblacional reciente en IJ/A/H/M/O-C y E-C/O. Esto coincide con las predicciones hechas previamente sobre el efecto de las variaciones demográficas durante los períodos glaciales en el Pleistoceno. Es decir, cada grupo estuvo sometido a cambios del tamaño efectivo poblacional luego de una reducción demográfica, probablemente asociado a la pérdida inicial de área durante las inundaciones en los interglaciales y un posterior crecimiento durante la exposición de los terrenos y aumento del área durante los glaciales. Esto sugiere que aunque el tiempo fue suficiente para que aumentara la diversidad haplotípica a través de mutaciones, no fue lo suficientemente largo como para acumular grandes diferencias entre las secuencias (Avice, 2000).

A diferencia de los haplogrupos anteriores, los resultados en O-PR son opuestos. La alta diversidad haplotípica y la relativamente baja diversidad nucleotídica sugieren expansión poblacional. Sin embargo, la distribución de las diferencias por pares de haplotipos y los estadísticos  $D$ ,  $F_s$  y  $R^2$  indican estabilidad demográfica. Una posible explicación pudiera ser que el número de muestras tomadas en este grupo fue insuficiente para tener una representación completa de las variantes genéticas presentes en el área de distribución. Sin embargo, a diferencia de las otras dos regiones, el área es mucho más pequeña, es una de las últimas áreas de Cuba en quedar emergidas (Iturralde-Vinent, 2006) y en correspondencia, las poblaciones son las más recientes según indica el modelo de dispersión más probable. Es decir, una combinación de área y tiempo de origen pueden hacer que las poblaciones de esta área se encuentren en estasis demográfica.

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica en *L. vittata* son similares a los reportados para otras especies de peces de agua dulce de Cuba (Anexo II). Sin embargo, los altos valores de  $h$  y los bajos valores de  $\pi$  dentro de los grupos genéticos que conforman las especies *Rivulus cylindraceus* y *Lucifuga dentata* (Ponce de León *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2016, respectivamente) también reflejan el efecto de procesos históricos, tal como se encontró en *L. vittata*.

#### IV.4. Morfología y grupos geográficos

En este trabajo se analizó la forma del cuerpo de *L. vittata* con un enfoque filogeográfico. Sin embargo, los resultados no evidenciaron alguna influencia del aislamiento geográfico en la forma del cuerpo de esta especie. Por el contrario, sí se encontró una relación positiva y significativa entre la distancia genética y las variaciones morfológicas entre las



poblaciones, aunque dichas variaciones no reflejaron el patrón biogeográfico que se obtuvo con los marcadores moleculares.

Parte de estos resultados pudieran estar relacionados con la disparidad de ecosistemas muestreados, producto de las variaciones en la abundancia de *L. vittata*. Durante el trabajo de campo se comprobó que aunque esta especie tiene una amplia distribución en Cuba, el número de individuos por localidad es independiente del tipo de ecosistema (río, laguna y arroyo, lejos o cerca de la costa). Sin embargo, como se verá posteriormente, las diferencias genéticas y el aislamiento geográfico a veces no se relacionan con la forma del cuerpo.

Las diferencias encontradas en la talla (resultados no presentados) y en la forma del cuerpo entre hembras y machos de *L. vittata* se pueden relacionar con sus roles específicos durante la reproducción. La mayor talla en las hembras parece favorecer que porten la descendencia, es decir, que alojen en su interior los embriones hasta que nacen (Rosen y Bailey, 1963; Pollux *et al.*, 2009). Además, la mayor distensión de la región abdominal en las hembras, respecto a los machos, está relacionada con la presencia de los embriones en el ovario y con los diferentes estadios de gestación.

Por el contrario, la función de los machos parece limitarse a la fertilización de los ovocitos dentro del sistema reproductor femenino y perseguir a las hembras para copular (Pilastro *et al.*, 1997, Deaton, 2008). Es precisamente esta última función la que pudiera determinar que los machos tengan el pedúnculo caudal más ancho que las hembras. A diferencia de otros poecílicos donde hay cortejo (Greven, 2005), en *L. vittata* sólo se ha descrito la fertilización a través una cópula forzada (Farr, 1984). Para lograr alcanzar a las hembras

debe ser crucial la presencia de un pedúnculo caudal ancho y musculoso que permita movimientos rápidos y cortas persecuciones.

Al parecer la forma del cuerpo no es un buen indicador de relaciones poblacionales en *L. vittata*. Esta característica puede estar determinada mayormente por presiones ambientales bióticas y/o abióticas (*e.g.*, selección sexual, presión por depredadores, por competidores y tipo de ecosistema) (Langerhans *et al.*, 2004; Langerhans *et al.*, 2007; Riesch *et al.*, 2016), de manera que el aislamiento geográfico tenga poca o ninguna influencia en la forma del cuerpo de estos peces. De estos factores, el tipo de ecosistema (costero vs tierra dentro) y la presión por depredadores pudieran ser algunas de los más importantes en *L. vittata*. De las siete localidades muestreadas, dos en la región occidental (Guanímar y Varahicacos) y una en la región oriental (Camaronera del Cauto) pueden considerarse hábitats costeros y el resto hábitats de tierra dentro. Asimismo, se tienen referencias sobre la presencia de especies piscívoras en ríos bajo un fuerte impacto antrópico (comunidades aledañas y especies exóticas invasoras) en la región oriental (Cautillo y San Juan). Sin embargo, el análisis de curvaturas relativas ni el análisis canónico mostraron un patrón evidente que pudiera reflejar el posible efecto de alguno de estos factores en la forma en alguno de los sexos.

Por otra parte, observaciones de campo indican variaciones fenotípicas entre poblaciones que habitan ecosistemas expuestos a diferentes niveles de salinidad. En estos casos, los machos tienen el cuerpo más ancho y robusto, muestran una mayor pigmentación, tanto en las aletas (dorsal y caudal) como en el cuerpo y, en particular, la aleta dorsal es muy larga. Aunque estos pudieran ser indicadores de determinadas presiones selectivas, el número de individuos encontrados no fue suficiente para probar alguna hipótesis. Tal vez un análisis

que además incluya una mayor variabilidad de ecosistemas y otro diseño de muestreo, permita esclarecer cuáles son los principales factores que están determinando la forma del cuerpo en *L. vittata*. Sin embargo, es de destacar que otras variables morfológicas, tal vez relacionadas con la reproducción como indicador de aislamiento entre poblaciones, pudieran reflejar la estructura genética identificada en esta especie.

#### *IV.5. Consideraciones para el manejo y conservación*

La evaluación de la diversidad genética es crucial para la genética poblacional y tiene aplicaciones muy importantes en el campo en biología de la conservación (*e.g.*, Morales *et al.*, 2011; Echelle *et al.*, 2013). Agapow *et al.* (2004) señalan que la preservación de la identidad genética de las especies debe ser prioridad en los esfuerzos para lograr una adecuada conservación de la biodiversidad a través de un manejo eficaz de las poblaciones. Uno de los principales retos ha sido contrarrestar la suposición que las especies son más importantes y menos sustituibles que las poblaciones (Taylor, 1999). Esto ha contribuido a la translocación indebida de peces, que supuestamente tienen amplia distribución (Gill y Kemp, 2002) o como controladores biológicos (Pyke, 2005; Stockwell y Henkanaththegedara, 2011), lo cual en muchas ocasiones se ha hecho sin una investigación previa del potencial de las especies nativas.

En Cuba, esta práctica se ha realizado fundamentalmente con poecílicos por la capacidad que tienen de alimentarse de mosquitos (y sus larvas) transmisores del dengue. En *Gambusia puncticulata* fue donde primero se encontraron evidencias de translocaciones en poecílicos: dos ríos de la región oriental del país (río Sagua de Tánamo en Holguín y río Miel en Guantánamo) tienen individuos del linaje de la región occidental (Lemus, 2013).

Sin embargo, en *G. punctata* todavía no hay evidencias de estas prácticas (Gutiérrez, 2016). La segunda evidencia de translocaciones en poecílicos se obtuvo mediante el presente trabajo. Al igual que en *G. puncticulata*, tres ríos en la región oriental, en este caso los ríos Sabanalamar, Yateras y Yacabo Abajo, tienen individuos con el haplotipo del grupo occidental IJA/H/M/O-C. Hasta el momento, la diversidad de poecílicos en las provincias Holguín y Guantánamo ha sido afectada por translocaciones. Sin embargo, un mayor número de acuatorios pudiera ser afectado dada la conexión física entre varias cuencas hidrográficas de la región.

## CONCLUSIONES

1. El análisis de las secuencias de los genes mitocondriales COI y RNC demostró que *Limia vittata* está formada por tres grupos genéticos discretos. La estructura genética poblacional que presenta esta especie sigue un patrón geográfico: 1- Oeste de Pinar del Río, 2- Isla de la Juventud/Artemisa/Habana/Matanzas/Oeste del centro de Cuba y 3- Este del centro de Cuba/Oriente.
2. El patrón de diferenciación genética espacial encontrado en *L. vittata* es muy similar al encontrado en varios grupos de peces y otros vertebrados en Cuba. Esto sugiere la acción de eventos históricos en la evolución de la fauna del archipiélago.
3. El dimorfismo sexual en *L. vittata* también se evidencia en la forma del cuerpo y la talla. Las principales diferencias, *i.e.*, mayor distensión abdominal en hembras y pedúnculo caudal más ancho en machos, se relacionan con los roles de cada sexo en la reproducción de la especie.
4. Las variaciones en la forma del cuerpo de *L. vittata* no se corresponden con las variaciones genéticas estimadas a partir de las secuencias de los genes COI y RNC. Además, el aislamiento geográfico tampoco parece haber determinado las variaciones en la forma del cuerpo de esta especie.

## RECOMENDACIONES

1. Analizar la diversidad genética y filogeografía de *Limia vittata* a partir de genes nucleares para obtener una mayor información sobre la evolución de la especie.
2. Analizar si las variaciones geográficas a nivel de ADNmt se corresponden con las variaciones morfológicas en el gonopodio y sus suspensorios.

## BIBIOLGRAFÍA

- Adams, D.C., Rohlf, F.J. y Slice, D.E. (2004): Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. Italian Journal of Zoology 71, 5–16.
- Agapow, P.-M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C. y Purvis, A. (2004): The impact of species concept on biodiversity studies. The Quarterly Review of Biology 79, 161–179.
- Alda, F., Reina, R. G., Doadrio, I. y Bermingham, E. (2013): Phylogeny and biogeography of the *Poecilia sphenops* species complex (Actinopterygii, Poeciliidae) in Central America. Molecular Phylogenetics and Evolution 66, 1011–1026.
- Alonso, R., Crawford, A. J. y Bermingham, E. (2012): Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: *Peltophryne*) based on mitochondrial and nuclear genes. Journal of Biogeography 39, 434–451.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N. y Clarke, K.R. (2008): PERMANOVA +for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E: Plymouth, UK. 214 pp.
- April, J., Mayden, R.L., Hanner, R.H. y Bernatchez, L. (2011): Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. PNAS 108, 10602–10607.
- Awise, J.C. (2000): Phylogeography: The history and formation of species. Harvard: Harvard University Press. 447 pp.
- Bagley, J.C., Alda, F., Breitman, M. F., Bermingham, E., van den Berghe, E. P. y Johnson, J.B. (2015): Assessing species boundaries using multilocus species delimitation in a morphologically conserved group of Neotropical freshwater fishes, the *Poecilia sphenops* species complex (Poeciliidae). PLoS ONE 10(4): e0121139.

- Bandelt, H-J., Forster, P y Röhl, A. (1999): Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16(1), 37–48.
- Barluenga, M., Stölting, K.N., Salzburger, W., Muschick, M. y Meyer, A. (2006): Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. Nature 439, 719–723.
- Baylac, M., C. Villemant, y Simbolotti, G. (2003): Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. Biological Journal of the Linnean Society 80, 89–98.
- Beaumont, M.A., Zhang, W. y Balding, D.J. (2002): Approximate Bayesian computation in population genetics. Genetics 162, 2025–2035.
- Bookstein, F.L., Chernoff, B., Elder, R.L., Humphries, J.M. Jr., Smith, G.R. y Strauss, R.E. (1985): Morphometrics in evolutionary biology. Special publication 15. Academy of Natural Sciences Press, Philadelphia.
- Bowen, B.W., Shanker, K., Yasuda, N, Malay, M.C..D, von der Heyden, S., Paulay, G., Rocha, L.A., *et al.* (2014): Phylogeography unplugged: Comparative surveys in the genomic era. Bulletin of Marine Science 90, 13–46.
- Breden, F., Ptacek, M., Rashed, M., Taphorn, D., y Augusto de Figueiredo, C. (1999): Molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 12 (2), 95–104.
- Briggs, J.C. (1984): Freshwater fishes and biogeography of Central America and the Antilles. Systematic Zoology 33, 428–435.
- Briggs, J.C. (1987): Biogeography and Plate Tectonics. Elsevier Science Publishing Company, Inc., New York, 204 pp.



- Brown, W.M. (1985): The mitochondrial genome of animals. En: Molecular evolutionary genetics (R. J. MacIntyre, Ed.). Plenum, Nueva York, EUA. pp. 95–130.
- Bruno, M.C., Mapelli, F.J., Casciotta, J.R., Almirón, A.E. y Lizarralde, M.S. (2016): Phylogeography of *Cnesterodon decemmaculatus* (Cyprinodontiformes: poeciilidae) in Southern Pampas, Argentina: ancient versus recent patterns in freshwater fishes. Environmental Biology of Fishes doi: 10.1007/s10641-016-0474-0
- Burgess, H.G. y Franz, R. (1989): Zoogeography of the Antillean freshwater fish fauna. En: Biogeography of the West Indies: Past, Present, and Future (C. A. Woods, Ed.). Sandhill Crane Press. Gainesville. pp. 263–304
- Clarke, K.R. y Warwick, R.M. (2001): Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Segunda edición. Primer-E, Ltd. Plymouth, UK.
- Cook, B.D., Bernays, S., Pringle, C.M. y Hughes, J.M. (2009): Marine dispersal determines the genetic population structure of migratory stream fauna of Puerto Rico: evidence for island- scale population recovery processes. Journal of the North American Benthological Society 28, 709–718.
- Corander, J. y Marttinen, P. (2006): Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. Molecular Ecology 15, 2833–2843.
- Corander J., Waldmann, P. y Sillanpaa M.J. (2003): Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. Genetics 163, 367–374.

- Cornuet, J.M., Santos, F., Beaumont, M.A., Robert, C.P., Marin, J.M., Balding, D.J., *et al.* (2008): Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to Approximate Bayesian Computations. Bioinformatics. 24(23), 2713–19.
- Corti, M. y Crosetti, D. (1996): Geographic variation in the grey mullet: a geometric morphometric analysis using 543 partial warp scores. Journal of Fish Biology 48, 255–269.
- Cote, I.M. y Perrow, M.R. (2006): Fish. En: Ecological Census Techniques: A Handbook (W. J. Sutherland, Ed.). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 250–277.
- Covich A. P. (2006): Dispersal – Limited biodiversity of tropical insular streams. Polish Journal of Ecology 54, 523–547.
- Crews, S.C. y Gillespie, R.G. (2010): Molecular systematics of *Selenops* spiders (Araneae: Selenopidae) from North and Central America: implications for Caribbean biogeography. Biological Journal of the Linnean Society 101, 288–322.
- Crispo, E., Bentzen, P., Reznick, D.N., Kinnison, M.T. y Hendry, A.P. (2006): The relative influence of natural selection and geography on gene flow in guppies. Molecular Ecology 15, 49–62.
- Cruz, A. (2014): Plasticidad fenotípica en *Gambusia punctata* (Actinopterygii: Poeciliidae): efecto del tipo de hábitat. Tesis de Diploma, Universidad de La Habana. 50 pp.
- Dadda, M., Pilastro, A. y Bisazza, A. (2005): Male sexual harassment and female schooling behaviour in the eastern mosquitofish. Animal Behaviour 70, 463–471.

- Darlington, P.J. (1938): Origin of the fauna of the Greater Antilles, with discussion of dispersal of animals over water and through the air. The Quarterly Review of Biology 13, 274–300.
- Dávalos, L.M. (2007): Short-faced bats (Phyllostomidae: Stenodermatina): a Caribbean radiation of strict frugivores. Journal of Biogeography 34, 364–375.
- Deaton, R. (2008): Factors influencing male mating behaviour in *Gambusia affinis* (Baird & Girard) with a coercive mating system. Journal of Fish Biology 72, 1607–1622.
- Doadrio, I., Perea, S., Alcaraz, L. y Hernández, N. (2009): Molecular phylogeny and biogeography of the Cuban genus *Girardinus* Poey, 1854 and relationships within the tribe Girardinini (Actinopterygii, Poeciliidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 50, 16–30.
- Dzulynski, S., Pszczolkowski, A. y Rudnicki, J. (1994): Observaciones sobre la génesis de algunos sedimentos terrígenos cuaternarios del occidente de Cuba. Revista Ciencias de la Tierra y del Espacio, v. 9, 75–90.
- Echelle, A.A., Fuselier, L., Van Den Bussche, R.A., Rodriguez, C.M.L. y Smith, M.L. (2006): Molecular systematics of Hispaniolan pupfishes (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*): Implications for the biogeography of insular Caribbean fishes. Molecular Phylogenetics and Evolution 39, 855–864.
- Echelle A.A., Lozano, M.L., Baker, S., Wilson, W.D., Echelle, A.F., Garrett, G.P. y Edwards, R.J. (2013): Conservation Genetics of *Gambusia krumholzi* (Teleostei: Poeciliidae) with Assessment of the Species Status of *G. clarkhubbsi* and Hybridization with *G. speciosa*, Copeia 1, 72–79.

- Eigenmann, C.H. (1903): The fresh-water fishes of western Cuba. Bulletin of the U. S. Fish Commission 22, 211–236.
- Engstrom, T.N., Shaffer, H.B. y McCord, W.P. (2004): Multiple Data Sets, High Homoplasy, and the Phylogeny of Softshell Turtles (Testudines: Trionychidae). Systematic Biology 53 (5), 693–710.
- Estoup, A., Jarne, P. y Cornuet, J-M. (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis Molecular Ecology 11, 1591–1604.
- Etienne, R.S., Haegeman, B., Stadler, T., Aze, T., Pearson, P. N., Purvis A. y Phillimore, A.B. (2012): Diversity-dependence brings molecular phylogenies closer to agreement with the fossil record. Proceeding of the Royal Society B 279, 1300–1309.
- Evans, J.P., Pilastro, A. y Schlupp, I. (Eds) (2011): Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes. The University of Chicago Press, Chicago. 424 pp.
- Excoffier, L. y Lischer, H. (2010): ARLEQUIN ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10, 564–7.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J. M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479–491.
- Fagundes, N.J.R., Ray, N., Beaumont, M., Neuenschwander, S., Salzano, F.M., Bonatto, S.L., *et al.* (2007): Statistical evaluation of alternative models of human evolution. PNAS. 104:17614–19.

- Farr, J.A. (1984): Premating behavior in the subgenus *Limia* (Pisces: Poeciliidae): Sexual selection and the evolution of courtship. Z. Tierpsychol. 65, 152–165.
- Fimia, R., Castillo, J.C., Cepero, O., Corona, E. y González, R. (2010): Eficacia del control de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) con peces larvívoros en Placetas, provincia Villa Clara, Cuba. Revista Electrónica de Veterinaria 11(3B), 1–8.
- Fink, W. L. (1971): A revision of the *Gambusia puncticulata* complex (Pisces: Poeciliidae). Publication of the Gulf Coast Research Laboratory Museum 2, 11–46.
- Fontanier, M. y Tobler, M (2009): A morphological gradient revisited: cave mollies vary not only in eye size. Environmental Biology of Fishes 86, 285–292.
- Fu, Y.X. (1997): Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147, 915–25.
- Futuyma, D.J. (2013): Evolution. Tercera edición. Stony Brook University, Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 660+i-36 pp.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. y Hurst, G.D.D. (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Molecular Ecology 18, 4541–4550.
- Galván-Quesada, S., I. Doadrio, F. Alda, A. Perdices, R.G. Reina, M. García Varela, *et al.* (2016): Molecular phylogeny and biogeography of the amphidromous fish genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). PLoS ONE 11(4), e0153538.
- García-Machado, E., Hernández, D., García-Debrás, A., Chevalier-Monteagudo, P., Metcalfe, C., Bernatchez, L. y Casane, D. (2011): Molecular phylogeny and phylogeography of the Cuban cave-fishes of the genus *Lucifuga*: Evidence for cryptic allopatric diversity. Molecular Phylogenetics and Evolution 61, 470–483.

- Ghedotti, M.J. y Wiley, E.O. (2002): Anablepidae, Poeciliidae, Rivulidae: Three family accounts. En: United Nations FAO Species Identification Guide for Fisheries Purposes: The living marine resources of the Western Central Atlantic (Carpenter, K. E., ed.) Vol.2. Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatide). FAO of the UN, the European Commission, and the American Society of Ichthyologists and Herpetologists (Special Pub. 5), USA.pp. 1154-1157.
- Gill, A.C. y Kemp, J.M. (2002): Widespread Indo-Pacific shore-fish species: a challenge for taxonomists, biogeographers, ecologists and fishery and conservation managers. Environmental Biology of Fishes 65, 165–174.
- Glor, R.E., Losos, J.B. y Larson, A. (2005): Out of Cuba: overwater dispersal and speciation among lizards in the *Anolis carolinensis* subgroup. Molecular Ecology 14, 2419–2432.
- Glor, R.E., Gifford, M.E., Larson, A., Losos, J.B., Rodríguez, L., Chamizo A.R. y Jackman, T.J. (2004): Partial island submergence and speciation in an adaptive radiation: a multilocus analysis of the Cuban Green anoles. Proceedings of the Royal Society of London B 271, 2257–2265.
- Greven, H. (2005): Structural and behavioral traits associated with sperm transfer in Poeciliinae. En: Viviparous fishes (M. C. Uribe y H. J. Grier, Eds.) New Life Publications, Homestead. pp. 145–163.
- Gutiérrez, M. A. (2016): Análisis filogenético del complejo de especies *Gambusia punctata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) en Cuba: nuevas evidencias de especiación críptica. Tesis de Maestría. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. ix + 79 pp.

- Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95–98.
- Hamilton, A. (2001): Phylogeny of *Limia* (Teleostei: Poeciliidae) based on NADH Dehydrogenase Subunit 2 sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 19, 277–289.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. y Ryan, P.D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4, 9 pp.
- Haney, R.A., Silliman, B.R., Fry, A.J., Layman, C.A. y Rand, D.M. (2007): The Pleistocene history of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*): Non-equilibrium evolutionary dynamics within a diversifying species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 43, 743–754.
- Hankison, S.J., Childress, M.J., Schmitter-Soto, J.J. y Ptacek, M.B. (2006): Morphological divergence within and between the Mexican sailfin mollies, *Poecilia velifera* and *Poecilia petenensis*. Journal of Fish Biology 68, 1610–1630.
- Haq, B.U., Hardenbol, J. y Vail, P.R. (1987): Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* 235, 1156–1166.
- Hassell, E. M. A., Meyers, P. J., Billman, E. J., Rasmussen, J. E. y Belk, M.C. (2012): Ontogeny and sex alter the effect of predation on body shape in a livebearing fish: sexual dimorphism, parallelism, and costs of reproduction. Ecology and Evolution 2, 1738–1746.

- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. y deWaard, J.R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences 270: 313–322.
- Hernández, D., Casane, D., Chevalier-Montegudo, P., Bernatchez, L. y García-Machado, E. (2016): Go West: A One Way Stepping-Stone Dispersion Model for the Cavefish *Lucifuga dentata* in Western Cuba. PLoS ONE 11(4), e0153545.
- Holsinger, K.E. (2012): Lecture Notes in Population Genetics. University of Connecticut, Connecticut. 270 pp.
- Hrbek, T., Seckinger, J. y Meyer, A. (2007): A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. Molecular Phylogenetics and Evolution 43, 986–998.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., Laviolette, N. *et al.* (2008): Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. PloS ONE 3, e2490.
- Hudson. R.R., Boos. D.D. y Kaplan. N.L. (1992): A statistical test for detecting geographic subdivision. Molecular Biology and Evolution 9, 138–51.
- Hudson, R.R. y Turelli, M. (2003): Stochasticity Overrides The “Three-Times Rule”: Genetic Drift, Genetic Draft, And Coalescence Times For Nuclear Loci Versus Mitochondrial DNA. Evolution 57(1), 182–190.
- Hugueny, B. (1989): West African rivers as biogeographic islands: Species richness of fish communities. Oecologia 79, 236–243.



- Ingley, S.J., Billman, E.J., Belk, M.C. y Johnson, J.B. (2014): Morphological Divergence Driven by Predation Environment within and between Species of *Brachyrhaphis* Fishes. PLoS ONE 9(2), e90274.
- Iturralde-Vinent, M.A. y MacPhee, R.D.E. (1999): Paleogeography of the Caribbean region: Implications for Cenozoic biogeography. Bulletin of the American Museum of Natural History 238, 1–95.
- Iturralde- Vinent, M.A. (2003): Ensayo sobre la Paleogeografía del Cuaternario en Cuba, V Congreso de Geología y Minería, 54–71 pp.
- Iturralde- Vinent, M.A., (2005): La Paleogeografía del Caribe y sus implicaciones para la biogeografía histórica, Revista del Jardín Botánico Nacional 25-26, 49–78.
- Iturralde-Vinent, M.A. (2006): Meso-Cenozoic Caribbean Paleogeography: Implications for the Historical Biogeography of the Region. International Geology Review 48 (9), 791–827.
- Jelks, H.L., Walsh, S.J., Burkhead, N.M., Contreras-Balderas, S., Díaz-Pasdo, E., Hendrickson, D. A., *et al.* (2008): Conservation status of imperiled North American freshwater and diadromous fishes. Fisheries Management and Ecology 33, 372–407.
- Kallman, K.D., Walter, R.B., Morizot, D.C. y Kazianis, S. (2004): Two new species of *Xiphophorus* (Poeciliidae) from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico, with a discussion of the distribution of *X. clemenciae* clade. American Museum Novitates 3441, 1–34.

- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33(7), 1870–1874.
- Klingenberg, C.P. (2016): Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. Dev Genes Evol 226, 113–137.
- Kobl Müller, S., Odhiambo, E.A., Sinyinza, D., Sturmbauer, C. y Sefc, K.M. (2015): Big fish, little divergence: phylogeography of Lake Tanganyika’s giant cichlid, *Boulengerochromis microlepis*. Hydrobiologia 748(1), 29–38.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. y Wilson, A.C. (1989): Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primer. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 6196–6200.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. y Guindon, S. (2012): PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Molecular Biology and Evolution 29 (6), 1695-1701.
- Langerhans, R.B., Layman, C.A., Shokrollahi, A.M., DeWitt, T.J. (2004): Predator-driven phenotypic diversification in *Gambusia affinis*. Evolution 58, 2305–2318.
- Langerhans, R.B., Gifford, M.E. y Joseph, E.O. (2007): Ecological speciation in *Gambusia* fishes. Evolution 61, 2056–2074.
- Langerhans, R.B., y Makowicz, A. M. (2009): Shared and unique features of morphological differentiation between predator regimes in *Gambusia caymanensis*. Journal of Evolution Biology 22, 2231–2242.

- Lara, A., Ponce de León, J. L., Rodríguez, R., Casane, D., Côté, G., Bernatchez L. y García-Machado, E. (2010): DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. Molecular Ecology Resources 10, 421–430.
- Lemus, E. (2013): Relaciones filogenéticas en el complejo de especies *Gambusia puncticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) en Cuba. Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 104 pp.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009): DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25, 1451–1452.
- Losos, J.B. (Ed.) (2009): Lizards in an Evolutionary Tree: Ecology and Adaptive Radiation of Anoles. University of California Press Berkeley Los Angeles London. 507 pp.
- Lucinda, P. H. F. y Reis, R. E. (2005): Systematics of the subfamily Poeciliinae Bonaparte (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), with an emphasis on the tribe Cnesterodontini Hubbs. Neotropical Ichthyology 3, 1–60.
- Lucinda, P.H.F. (2003): Family Poeciliidae. En: Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J., Eds.). Porto Alegre, Brazil. 555–581 pp.
- Lydeard, C., Wooten, M.C., Meyer, A. (1995a): Molecules, morphology, and area cladograms: A cladistic and biogeographic analysis of *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae). Systematic Biology 44 (2), 221–236.
- Lydeard, C., Wooten, M.C., Meyer, A. (1995b): Cytochrome b sequence variation and a molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Canadian Journal of Zoology 73, 213–227.

- MacPhee, R.D.E. e Iturralde-Vinent, M.A. (2005): The Interpretation of Caribbean Paleogeography: Reply to Hedges. En: Proceedings of the International Symposium “Insular Vertebrate Evolution: the Palaeontological Approach” (J.A. Alcover y P. Bover, Eds.). Monografies de la Societat d’Història Natural de les Balears 12, 175–184.
- Mantel, N. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27, 209–220.
- Marroig, G. (2007): When size makes a difference: allometry, life-history and morphological evolution of capuchins (*Cebus*) and squirrels (*Saimiri*) monkeys (Cebinae, Platyrrhini). BMC Evolutionary Biology 7, 20.
- Matthew, W.D. (1915): Climate and evolution. Annals of the New York Academy of Sciences 24, 171–318.
- Meredith, R.W., Pires, M.N., Reznick, D.N. y Springer, M.S. (2010): Molecular phylogenetic relationships and the evolution of the placenta in *Poecilia* (*Micropoecilia*) (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 55, 631–639.
- Meredith, R. W., Pires, M. N., Reznick, D. N. y Springer, M. S. (2011): Molecular phylogenetic relationships and the coevolution of placentotrophy and superfetation in *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 59, 148–157.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki, P. y Wilson, A.C. (1990): Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial-DNA sequences. Nature 347, 550–3.

- Meyer, A. (1993): Reinstatement of *Micropoecilia* Hubbs, 1926, with a redescription of *M. bifurca* (Eigenmann, 1909) from Northeast South America (Teleostei, Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden 47, 121–130.
- Morales, P., Vila, I. y Poulin, E. (2011): Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. Conservation Genetic 12, 1639–1643.
- Morlon, H., Parsons, T.L. y Plotkin, J.B. (2011): Reconciling molecular phylogenies with the fossil record. PNAS 108(39), 16327–16332.
- Myers, G.S. (1938): Fresh-water fishes and West Indian Zoogeography. Board of Regents of the Smithsonian Institution 92, 339–364.
- Nelson, J. S. (2006): Fishes of the World. Cuarta edición. Hoboken: John Wiley & Sons. New Jersey. 601 pp.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. y Grabowski, G. (1991): The simple fool's guide to PCR. Honolulu, HI: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. of Hawaii.
- Parenti, L.R. (1981): A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). Bulletin of the American Museum of Natural History 168(4), 335–557.
- Park, P.J., W.E. Aguirre, *et al.* 2013. Landmark-Based Geometric Morphometrics: What Fish Shapes Can Tell Us about Fish Evolution. Tested Studies for Laboratory Teaching Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education 34, 361–371.

- Perdices, A., Doadrio, I. y Bermingham, E. (2005): Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands inferred from their molecular phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution 37, 460–473.
- Pilastro, A., Giacomello, E. y Bisazza, A. (1997): Sexual selection for small size in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). Proceedings of the Royal Society of London B 264, 1125–1129.
- Pindell, J.L. (1994): Evolution of the Gulf of Mexico and the Caribbean. Caribbean Geology: An Introduction (S.K. Donovan and T.A. Jackson, Eds.). University of the West Indies Publishers Association/University of the West Indies Press, Kingston. pp. 13–39
- Pires, M.N., Arendt J. y Reznick D.N. (2010):. The evolution of placentas and superfetation in the fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: subgenera *Micropoecilia* and *Acanthophaelus*). Biological Journal of the Linnean Society 99, 784–796.
- Pitman, W.C., III, Cande, S., LaBrecque, J. y Pindell, J. (1993): Fragmentation of Gondwana: The separation of Africa from South America. En: Biological Relationships between Africa and South America (P. Goldblatt, Ed.). Yale University Press, New Haven. pp. 405–439.
- Poey, F. (1854): Los guajacones, pececillos de agua dulce. Memorias de la Historia Natural de la Isla de Cuba 1(32), 374–392.

- Pollux, B.J.A, Pires, R., Banet, A.I. y Reznick, D.N. 2009. Evolution of placentas in the fish family Poeciliidae: An empirical study of macroevolution. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 40, 271–289.
- Pollux, B.J.A., Meredith, R.W., Springer, M.S., Garland, T. y Reznick, D.N. (2014): The evolution of the placenta drives a shift in sexual selection in livebearing fish. Nature 513, 233–236.
- Ponce de León, J.L., Rodríguez, R., Acosta, M. y Uribe, M.C. (2011): Egg size and its relationship with fecundity, newborn length and female size in Cuban poeciliid fishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). Ecology of Freshwater Fish 20, 243–250.
- Ponce de León, J.L. (2012): Estrategias de historia de vida relacionadas con la reproducción de la familia Poeciliidae (Actinopterygii: Cyprinodontiformes) en Cuba: Patrones opuestos en ambientes lóticos y lénticos. Tesis de Doctorado, Universidad de La Habana, 120 pp.
- Ponce de León, J.L., Rodríguez, R. y León, G. (2013b): Life-history patterns of Cuban poeciliid fishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). Zoo Biology 32, 251–256.
- Ponce de León, J.L., León, G., Rodríguez, R., Metcalfe, C.J., Hernández, D., Casane, D. y García-Machado, E. (2014): Phylogeography of Cuban *Rivulus*: Evidence for allopatric speciation and secondary dispersal across a marine barrier. Molecular Phylogenetics and Evolution 79, 404–414.
- Ponce de León, J.L. y Rodríguez, R. (2010a): Peces cubanos de la familia Poeciliidae. Guía de Campo. Editorial Academia, Ciudad Habana, 30 pp.
- Pyke, G.H. (2005): A review of the biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. Reviews in Fish Biology and Fisheries 15, 339–365.

- Ramos-Onsins, S.E. y Rozas, J. (2002): Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Molecular Biology and Evolution 19, 2092–0.
- Rauchenberger, M. (1988): Historical biogeography of Poeciliid fishes in the Caribbean. Systematic Zoology 37(4), 356–365.
- Rauchenberger, M. (1989): Systematics and biogeography of the genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Novitates American Museum of Natural History. 74 pp.
- Regan, C.T. (1913): A revision of the Cyprinodont fishes of the subfamily Poeciliinae. Proceedings of the Zoological Society 5, 977–1019.
- Říčan, O., Piálek, L., Zardoya, R., Doadrio, I. y Zrzavý, J. (2012): Biogeography of the Mesoamerican Cichlidae (Teleostei: Heroini): Colonization through the GAARlandia land bridge and early diversification. Journal of Biogeography doi:10.1111/jbi.12023
- Riesch, R., Tobler, M., Lerp, H., Jourdan, J., Dumas, T., Nosil, P., *et al.* (2016): Extremophile Poeciliidae: multivariate insights into the complexity of speciation along replicated ecological gradients. BMC Evolutionary Biology 16, 136.
- Rivas, L.R. (1958): The origin, evolution, dispersal and geographical distribution of the Cuban poeciliid fishes of the tribe Girardinini. The American Philosophical Society 102, 281-320.
- Rivas, L.R. (1963): Subgenera and species groups in the poeciliid fish genus *Gambusia* Poey. Copeia 2, 331–347.



- Rivas, L.R. (1978): A new species of poeciliid fish of the genus *Poecilia* from Hispaniola, with reinstatement and redescription of *P. dominicensis* (Evermann and Clark). Northeast Gulf Science 2, 98–112.
- Rivas, L.R. (1986): Comments on Briggs (1984): Freshwater fishes and biogeography of Central America and the Antilles. Systematic Zoology 35(4), 633–639.
- Rivas, L.R. y Fink, W.L. (1970): A new species of poeciliid fish of the genus *Limia* from the island of Grand Cayman, BWI. Copeia 2, 270–274.
- Rodríguez, A., Vences, M., Nevado, B., Machordom, A. y Verheyen, E. (2010): Biogeographic origin and radiation of Cuban *Eleutherodactylus* frogs of the *auriculatus* species group, inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 54, 179–186.
- Rodríguez, C.M. (1997): Phylogenetic analysis of the tribe Poeciliini (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Copeia 663–679.
- Rodríguez-Machado, S. y Ponce de León, J.L. (2017): Peces de agua dulce. En: Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas (C. A. Mancina y D. D. Cruz, Eds.). Editorial AMA, La Habana. En prensa.
- Rogers, A.R. y Harpending, H. (1992): Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. Molecular Biology and Evolution 9, 552–569.
- Rohlf, F.J. (1990): Rotational fit (Procrustes) methods. En: Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop (Rohlf, F. J., y Bookstein, F. L., Eds). Special Publication No. 2. Ann Arbor: Univ. of Michigan Museum of Zoology. pp. 227-236.

- Rohlf, F.J. (2007): TpsRelw, relative warps, ver. 1.45. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. (2008): TpsDig, digitize landmarks and outlines, ver. 2.12. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rosen, D.E. y Bailey, R.M. (1963): The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography, and systematics. Bulletin of the American Museum of Natural History 126, 1–176.
- Rosen, D.E. y Gordon, M. (1953): Functional anatomy and evolution of male genitalia in Poeciliid fishes. Zoologica 38, 1–47.
- Rosen, D.E. (1976): A vicariance model of Caribbean biogeography. Systematic Zoology 24 (4), 431–464.
- Rosen, D.E. (1978): Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. Systematic Zoology 27, 159–188.
- Rosen, D.E. (1985): Geological hierarchies and biogeographic congruence in the Caribbean. Annals of the Missouri Botanical Garden 72, 636–659.
- Roukoniemi, M. y Kvist, L. (2002): Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. Molecular Phylogenetics and Evolution 23, 422–432.
- Roy, D., Paterson, G., Hamilton, P.B., Heath, D.D. y Haffner, G.D. (2007): Resource-based adaptive divergence in the freshwater fish *Telmatherina* from Lake Matano, Indonesia. Molecular Ecology 16, 35–48.
- Schartl M. (2014): Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. Disease Models & Mechanisms 7(2), 181–92.

- Schartl, M., Walter, R.B., Shen, Y., Garcia, T., Catchen, J., Amores, A., Braasch, I., *et al.* (2013): The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. Nature Genetics 45(5), 567–572.
- Schneider, S. y Excoffier, L. (1999): Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. Genetics 152, 1079–89.
- Schuchert, C. (1935): Historical geology of the Antillean-Caribbean region. John Wiley & Sons. New York.
- Stockwell, C. y Henkanaththegebara, S. (2011): Evolutionary Conservation Biology. En: Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (J. P. Evans, A. Pilastro e I. Schlupp, Eds.). The University of Chicago Press, Chicago. pp. 128–144.
- Tajima, F. (1989): Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123, 585–95.
- Tang, Q., Liu, H., Mayden, R. y Xiong, B. (2006): Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 39, 347–357.
- Taylor, E.B. (1999): Species pairs of north temperate freshwater fishes: evolution, taxonomy, and conservation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9, 299–324.
- Tobler, M., Riesch, R., García de León F.J., Schlupp, I. y Plath, M. (2008): A new and morphologically distinct population of cavernicolous *Poecilia mexicana* (Poeciliidae: Teleostei). Environmental Biology of Fishes 82, 101–108.

- Tobler, M., Arias-Rodriguez, L., Palacios, Lauren, M., Chapman, J., García, F. J., Mitrofanov, I. y Mateos, M. (2011): Evolution in extreme environments: replicated phenotypic differentiation in livebearing fish inhabiting sulfidic springs. Evolution 65, 2213–2228.
- Tomecek, J., Kovac V. y Katina S. 2005. Ontogenetic variability in external morphology of native (Canadian) and non-native (Slovak) populations of pumpkinseed *Lepomis gibbosus* (Linnaeus 1758). Journal of Applied Ichthyology 21, 335–344.
- Valdés Montero, J. F. (editor) (2000): Diccionario Geográfico de Cuba. Oficina Nacional de Hidrografía y Geodesia, La Habana. 386 pp. ISBN: 959-7049-08-2
- Vázquez-Miranda, H., Navarro-Sigüenza A.G. and Morrone, J.J. (2007): Biogeographical patterns of the avifaunas of the Caribbean Basin Islands: a parsimony perspective. Cladistics 23, 180–200.
- Vergara, R.R. (1992): Principales características de la ictiofauna dulceacuícola cubana. Información adicional (N. R. Garrido, Ed.). Editorial Academia. La Habana. 27 pp.
- Walter, R.P., Blum, M.J., Snider, S.B., Paterson, I.G., Bentzen, P., Lamphere, B.A. y Gilliam, J.F. (2011): Isolation and differentiation of *Rivulus hartii* across Trinidad and neighbouring islands. Molecular Ecology 20, 601–618.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., *et al.* (2005): DNA barcoding Australia's fish species. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360, 1847–1857.
- Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953): Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. Nature 4361, 964–967.

- Weaver, P.F., Cruz, A., Johnson, S., Dupin, J. y Weaver, K.F. (2016): Colonizing the Caribbean: biogeography and evolution of livebearing fishes of the genus *Limia* (Poeciliidae). Journal of Biogeography doi:10.1111/jbi.12798.
- Willmore, K.E.H, Klingenberg, C.P. y Hallgrímsson, B. 2005. The relationship between fluctuating asymmetry and environmental variance in rhesus macaque skulls. Evolution 59(4), 898–909.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. y Fink, W.L. 2004. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Zúñiga-Vega, J.J., Reznick, D.N. y Johnson, J.B. (2007): Habitat predicts reproductive superfetation and body shape in the livebearing fish *Poeciliopsis turrubarensis*. Oikos 116, 995–1005.

## ANEXOS

**Anexo I.** Sitios de colecta, código de identificación, coordenadas geográficas (grados decimales) y número de individuos colectados (n) de *Limia vittata* en Cuba. Los valores entre paréntesis representan el número de hembras (izquierda) y machos (derecha) incluidos en el análisis morfométrico.

| No. | Sitio                     | Código | Provincia           | Latitud | Longitud | n          |
|-----|---------------------------|--------|---------------------|---------|----------|------------|
| 1   | Cayo Campo                | Lcam   | Isla de la Juventud | 21,5728 | -82,2951 | 1          |
| 2   | Cayo Cantiles             | Lcca   | Isla de la Juventud | 21,6235 | -81,9704 | 3          |
| 3   | Cayo La Leña              | Lle    | Isla de la Juventud | 21,6299 | -81,0813 | 4          |
| 4   | Estero del Alto del Negro | Len    | Pinar del Río       | 21,8260 | -84,8941 | 4          |
| 5   | Caleta del Piojo          | Lcp    | Pinar del Río       | 21,8248 | -84,8706 | 3          |
| 6   | Laguna Lugones            | Llu    | Pinar del Río       | 21,9443 | -84,4077 | 2          |
| 7   | El Vajazal                | Lva    | Pinar del Río       | 22,4183 | -84,3250 | 1          |
| 8   | Guanímar                  | Lgu    | Artemisa            | 22,6945 | -82,6516 | 3 (24, 18) |
| 9   | Río Cristal               | Lcri   | La Habana           | 23,0333 | -82,4010 | 4          |
| 10  | Hicacos                   | Lhc    | Matanzas            | 23,1928 | -81,1620 | 3 (26, 21) |
| 11  | Soplillar                 | Lso    | Matanzas            | 22,2913 | -81,1505 | 4          |
| 12  | Laguna de Facundo         | Llf    | Matanzas            | 22,2194 | -81,1322 | 5          |
| 13  | Río Arimao                | Lar    | Cienfuegos          | 22,0545 | -80,2976 | 9 (16, 21) |
| 14  | Río San Juan              | Lsj    | Cienfuegos          | 21,9204 | -80,2766 | 4          |
| 15  | Arroyo Cabrales           | Lbl    | Villa Clara         | 22,1777 | -79,6825 | 2          |
| 16  | Mayajigua                 | Lmg    | Sancti Spiritus     | 22,2434 | -79,0741 | 5          |
| 17  | Río Jobabo                | Ljo    | Las Tunas           | 20,9259 | -77,3066 | 1          |
| 18  | Río Mano                  | Lno    | Holguín             | 21,0815 | -76,3568 | 3          |
| 19  | Río Matamoros             | Lrm    | Holguín             | 20,8753 | -76,3097 | 3          |
| 20  | Río Cacoyugiún            | Lui    | Holguín             | 21,0537 | -76,2304 | 5 (20, 18) |
| 21  | Arroyo Almirante          | Laa    | Holguín             | 20,9157 | -76,2212 | 2          |
| 22  | Río Gibara                | Lrg    | Holguín             | 20,9425 | -76,1047 | 2          |
| 23  | Río Camazán               | Lcz    | Holguín             | 20,7889 | -76,1022 | 4          |

|    |                      |      |                  |         |          |            |
|----|----------------------|------|------------------|---------|----------|------------|
| 24 | Guabajaney           | Lgb  | Holguín          | 21,0125 | -76,0120 | 2          |
| 25 | Nipe                 | Lni  | Holguín          | 20,6656 | -75,8266 | 5          |
| 26 | Tasajeras            | Ltj  | Holguín          | 20,9422 | -75,7753 | 4          |
| 27 | Río Téneme           | Lte  | Holguín          | 20,6783 | -75,4207 | 3          |
| 28 | Río Grande           | Lab  | Holguín          | 20,6382 | -75,3092 | 5          |
| 29 | Sagua de Tánamo      | Lst  | Holguín          | 20,5516 | -75,2555 | 2          |
| 30 | Río Sevilla N        | Lse  | Granma           | 20,0470 | -77,5202 | 3          |
| 31 | Río Macaca           | Lma  | Granma           | 20,1180 | -77,4596 | 2          |
| 32 | Río Vicana           | Lvc  | Granma           | 20,1443 | -77,4366 | 5          |
| 33 | Camaronera del Cauto | Lcc  | Granma           | 20,5716 | -77,0092 | 3 (23, 18) |
| 34 | Municipio Río Cauto  | Lrc  | Granma           | 20,5695 | -76,9193 | 4          |
| 35 | Río Yara             | Lyar | Granma           | 20,2736 | -76,9660 | 5          |
| 36 | Río Cautillo         | Lci  | Granma           | 20,3452 | -76,5280 | 4 (18, 19) |
| 37 | Río Contramaestre    | Lcm  | Santiago de Cuba | 20,3006 | -76,2382 | 3          |
| 38 | Río Cauto            | Lcu  | Santiago de Cuba | 20,2528 | -75,9840 | 2          |
| 39 | Río Cobre            | Lcb  | Santiago de Cuba | 20,0508 | -75,9399 | 3          |
| 40 | Río Melgarejo        | Lmo  | Santiago de Cuba | 20,0562 | -75,9380 | 4          |
| 41 | Los Guaos            | Lgs  | Santiago de Cuba | 20,0342 | -75,8583 | 1          |
| 42 | Río Guananicum       | Lgn  | Santiago de Cuba | 20,1735 | -75,8122 | 1          |
| 43 | Río San Juan         | Lsu  | Santiago de Cuba | 20,0468 | -75,7977 | 3 (24, 24) |
| 44 | Canal a Siboney      | Lcs  | Santiago de Cuba | 19,9652 | -75,7065 | 2          |
| 45 | Río Jaibo            | Ljb  | Guantánamo       | 20,1626 | -75,2308 | 1          |
| 46 | Río Bano             | Lbo  | Guantánamo       | 20,1606 | -75,2038 | 2          |
| 47 | Río Yateras          | Lyat | Guantánamo       | 20,0147 | -75,0325 | 4          |
| 48 | Río Sabanalamar      | Lsa  | Guantánamo       | 20,0579 | -74,8030 | 2          |
| 49 | Río Yacabo Abajo     | Lyj  | Guantánamo       | 20,0551 | -74,6954 | 3          |

**Anexo II.** Número de individuos (n), número de pares de bases (pb), número de haplotipos (H), diversidad haplotípica ( $h \pm DE$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi \pm DE$ ) de varias especies de peces de agua dulce de Cuba. <sup>1</sup> Ponce de León *et al.* (2014), <sup>2</sup> Gutiérrez (2016), <sup>3</sup> Hernández *et al.* (2016)

| <b>Especie (gen mitocondrial)</b>                    | <b>n</b> | <b>pb</b> | <b>H</b> | <b><math>h \pm DE</math></b> | <b><math>\pi \pm DE</math></b> |
|--|----------|-----------|----------|------------------------------|--------------------------------|
| <i>Limia vittata</i> (COI)                           | 150      | 628       | 56       | 0,884 $\pm$ 0,022            | 0,0089 $\pm$ 0,0058            |
| <i>Limia vittata</i> (RNC)                           | 150      | 420       | 49       | 0,866 $\pm$ 0,023            | 0,0140 $\pm$ 0,0008            |
| <i>Rivulus cylindraceus</i> (cytb) <sup>1</sup>      | 97       | 754       | 30       | 0,830 $\pm$ 0,032            | 0,0118 $\pm$ 0,0009            |
| <i>Rivulus berovidesi</i> (cytb) <sup>1</sup>        | 24       | 754       | 7        | 0,685 $\pm$ 0,077            | 0,0024 $\pm$ 0,0007            |
| <i>G. rhizophorae</i> (cytb) <sup>2</sup>            | 21       | 689       | 9        | 0,841 $\pm$ 0,003            | 0,0130                         |
| <i>G. punctata sensu stricto</i> (cytb) <sup>2</sup> | 37       | 689       | 12       | 0,758 $\pm$ 0,004            | 0,0090                         |
| <i>Gambusia</i> sp. A (cytb) <sup>2</sup>            | 20       | 689       | 9        | 0,895 $\pm$ 0,001            | 0,0032                         |
| <i>Gambusia</i> sp. B (cytb) <sup>2</sup>            | 41       | 689       | 11       | 0,673 $\pm$ 0,006            | 0,0026                         |
| <i>Lucifuga dentata</i> (cytb+RNC) <sup>3</sup>      | 90       | 1217      | 49       | 0,979 $\pm$ 0,005            | 0,0100 $\pm$ 0,0050            |