

**CENTRO DE INVESTIGACIONES MARINAS  
UNIVERSIDAD DE LA HABANA**

---

**Código de barras de ADN  
de las especies cubanas de peces  
dulceacuícolas.**

**Tesis en opción al grado de Maestro en Biología Marina y Acuicultura, Mención  
Ecología Marina.**

**Autor:**

**Lic. Ariagna Lara Lorenzo**

**Tutores:**

**Dr. Erik García Machado**

**M.C. José Luis Ponce de León García**

**Ciudad de La Habana, 2008**

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>ii</b>
<b>1. Revisión Bibliográfica</b> .....	<b>1</b>
1.1. Código de barras de ADN .....	1
1.1.1 Principales usos del código de barras del ADN.....	2
1.1.2 Principales limitaciones del código de barras.....	3
1.1.3 Polémica actual sobre el código de barras de ADN.....	3
1.2. Marcadores moleculares.....	4
1.2.1 ADN mitocondrial .....	5
1.2.2 La secuencia del gen citocromo oxidasa I (COI) como código de barras.....	6
1.3. Características generales y distribución de los peces dulceacuícolas de Cuba.....	7
1.3.1 Características generales en Cuba, de las familias estudiadas.....	9
1.3.2 Distribución de las especies en estudio.....	11
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>13</b>
2.1. Clasificación taxonómica .....	13
2.2. Material biológico .....	13
2.3. Análisis del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI).....	14
2.3.1 Obtención del ADN total.....	14
2.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación.....	14
2.4. Análisis de las secuencias.....	15
<b>3. Resultados</b> .....	<b>19</b>
3.1. Identificación de las especies sobre la base de estimados de divergencia.....	19
3.1.1 Géneros y especies identificadas de manera inequívoca .....	19
3.1.2 Géneros y especies que muestran incongruencias en la identificación.....	24
3.1.2.1 Género <i>Gambusia</i> .....	24
3.1.2.2 Género <i>Rivulus</i> .....	25
3.1.2.3 Género <i>Cubanichtys</i> .....	25
3.2. Identificación de las especies sobre la base del análisis de caracteres nucleotídicos .....	27
3.2.1 Género <i>Gambusia</i> .....	27
3.2.2 Género <i>Rivulus</i> .....	28
3.2.3 Género <i>Girardinus</i> .....	28
<b>4. Discusión</b> .....	<b>37</b>
4.1. Género <i>Lucifuga</i> .....	38
4.2. Género <i>Girardinus</i> .....	38
4.3. Género <i>Rivulus</i> .....	38
4.4. Género <i>Gambusia</i> .....	40
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>44</b>
<b>6. Recomendaciones</b> .....	<b>45</b>

<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>

## Resumen

En el presente trabajo se realizó el análisis del código de barras ADN de 24 especies de la ictiofauna dulceacuícola cubana. Para ello, se secuenciaron 652pb del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) de 96 individuos provenientes de diferentes áreas geográficas y representativos, en la mayoría de los casos, de la distribución espacial de cada especie. En el análisis se utilizó la distancia genética Kimura 2 parámetros (K2P), considerando como cota superior el valor de 3%, para identificar los límites de divergencia entre especies. Complementariamente se llevó a cabo un análisis de agregación poblacional para identificar grupos poblacionales indicativos de linajes evolutivos independientes. El estimado promedio de divergencia genética entre individuos coespecíficos fue de 0.96%, mientras que el valor encontrado entre especies congénéricas alcanzó el 10.2%. La identificación de las especies a través de este marcador molecular coincidió en un 96% con la clasificación taxonómica establecida. Solo se observaron incongruencias en el caso del género *Rivulus*, donde no se pudo identificar molecularmente a la especie *R. insulaepinorum*. Por otra parte, el género *Gambusia* presentó una mayor diversidad de especies, al identificarse varios linajes evolutivos significativos. De manera general, el código de barras del ADN constituye una herramienta eficaz para la identificación de los peces de agua dulce de Cuba y una vía rápida para identificar posibles linajes independientes que puedan ser motivo de estudios posteriores más profundos.

### Introducción

La fauna de Cuba posee características intrínsecas, debido a su origen diverso y a la compleja evolución paleogeográfica del archipiélago que hoy percibimos. Se distingue, como otras regiones insulares por la existencia de un fuerte endemismo distribuido por todo el territorio, indicativo de recurrentes y complejos procesos de dispersión y de vicarianza. Dichos patrones han sido modelados no solamente por factores ecológicos históricos, sino también por la interacción del hombre con la naturaleza. Esto último caracterizado en la mayoría de los casos, por impactos negativos que han conllevado a la extinción de decenas de especies y a la fragmentación de sus áreas de distribución. La ictiofauna fluvial cubana, es un caso interesante pues debido a sus posibilidades, relativamente limitadas para la dispersión, ha estado sometida tanto a los efectos históricos naturales como a los antrópicos. Datos recientes revelan que existen proporciones alarmantes de especies naturalizadas en lugares donde nunca antes se habían descrito (Elvira y Almodóvar, 2001). Los efectos de la introducción de especies de peces exóticos sobre las poblaciones nativas generalmente son negativos. Estos van desde la alteración del hábitat, introducción de enfermedades, exclusión competitiva, depredación y la hibridación (Hill, 2002). En todos los casos el efecto a largo plazo es la erosión de la biodiversidad y del fondo genético de las especies, comprometiendo el futuro evolutivo de los diferentes linajes.

En Cuba, los estudios sobre especies dulceacuícolas han versado esencialmente sobre aspectos taxonómicos (Poey 1854; Eigenmann 1903; Rivas 1958; Rivero y Rivas, 1944; Alayo 1973; Vergara 1992) y acerca de su utilidad como control de vectores que afectan al hombre (García y Koldenkova 1990; Rodríguez *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2007).

La clasificación taxonómica se ha sustentado en la mayoría de los casos en pocos caracteres diagnósticos, lo que puede estar influyendo en que se subestime o sobreestime la verdadera diversidad existente en nuestros acuatorios naturales. En casos como este los estudios basados en los caracteres moleculares han sido de gran utilidad para la discriminación de especies, ya sea con el empleo directo de la secuencia de ADN o indirectamente a través de análisis de proteínas. Recientemente, sobre la base de todo el conocimiento acumulado en los últimos decenios de estudios moleculares, Hebert *et al.* (2003a), sugirieron que la secuencia de un único gen podría ser suficiente para diferenciar, en cualquier estadio de vida, todas o al menos la mayoría de las especies. Con este propósito propusieron el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) como un sistema

estandarizado para la identificación de animales. Esta metodología se conoce como código de barras de ADN, por analogía con el código de barras empleado para identificar a los productos que son comercializados.

Teniendo en cuenta que la información taxonómica que existe acerca de los peces dulceacuícolas cubanos se sustenta, esencialmente, en un número limitado de caracteres morfológicos; la valoración de otras fuentes de datos, como los marcadores moleculares, puede aportar datos valiosos sobre la diversidad de los diferentes *taxa* definidos actualmente. En este sentido, se propone la siguiente **hipótesis** de trabajo:

La metodología del código de barras de ADN permite identificar las especies de peces dulceacuícolas de Cuba.

Para comprobar la hipótesis antes planteada se propone el siguiente **objetivo**:

- Emplear secuencias parciales del gen mitocondrial COI como marcador molecular para estimar niveles de divergencia y caracteres nucleotídicos diagnósticos en el contexto metodológico propuesto para el código de barras de ADN.

## 1. Revisión Bibliográfica

### 1.1. Código de barras de ADN

La diversidad del planeta está enfrentando una crisis global debido a la pérdida de especies cada vez más acelerada (Bellwood *et al.* 2004). Los taxónomos han realizado un trabajo excelente al describir las especies, sin embargo el problema es que en 250 años de desarrollo de esta disciplina solo se han descrito alrededor de un millón y medio, siendo la estimación del número total de al menos 10 millones (Stoeckle, 2003). Una de las causas fundamentales de este hecho es la disminución desde hace algún tiempo del “fondo” de taxónomos a nivel mundial, siendo esto una señal de la necesidad de emplear nuevos métodos para el reconocimiento rápido de especies (Herbert *et al.* 2003a).

Al mismo tiempo del decline de la taxonomía tradicional, la biología molecular ha mostrado grandes avances, fundamentalmente con el desarrollo de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987). Conjuntamente con ello ha aumentado el número de secuencias contenidas en bases de datos online (Ej. GenBank), que son de fácil acceso, y por tal motivo han sido empleadas como fuente de datos para identificar y diferenciar poblaciones y especies (Barber y Boyce, 2006). De esta manera, constituyen una herramienta complementaria a la taxonomía convencional para el estudio de la biodiversidad (Ebach y Holdrege, 2005)

Debido a los factores antes mencionados Herbert *et al.* (2003a) propusieron el llamado código de barras del ADN, que es un método taxonómico estandarizado, basado en el empleo de secuencias cortas de ADN; cuyo objetivo principal es que cualquier persona, en cualquier lugar y momento pueda determinar a la especie que pertenece un espécimen determinado, sin la necesidad de ser especialista del grupo en cuestión; además de potenciar el descubrimiento de nuevas especies (Stoeckle, 2003).

El fundamento básico del código de barras de ADN, no es nuevo, teniendo en cuenta la larga historia del uso de marcadores moleculares (Ej: aloenzimas, ADN<sub>r</sub>, ADN<sub>mt</sub>) con el mismo propósito, sin embargo si resulta muy novedoso el aspecto referente a la estandarización del marcador a utilizar (Moritz y Cicero, 2004). Estos autores hacen referencia además a la importancia de tener en cuenta, para el desarrollo correcto de esta metodología, un muestreo que abarque todo el rango de distribución de las especies objeto

de estudio. Posibilitando con ello que se puedan establecer con claridad los límites de variación intraespecífica respecto a los interespecíficos.

### 1.1.1 Principales usos del código de barras del ADN

La principal ventaja del código de barras del ADN es que permite la identificación de especies, aplicando un criterio estandarizado que se sustenta en el empleo de un mismo marcador molecular y valores de divergencia genética homogéneos para todos los *taxa*. Estas características ofrecen, sin dudas, grandes ventajas en áreas tales como la biología de la conservación, que incluye inventarios de la biodiversidad (Hebert *et al.*, 2003a).

Es posible utilizarse además, donde los métodos tradicionales presentan limitaciones, como por ejemplo, en cualquier estadio de vida (huevos, larvas, juveniles, adultos); en análisis de contenido estomacal o de excretas (Stoeckle, 2003; Bourlat *et al.* 2008).

Constituye una herramienta importante en el control de especies invasoras, de plagas. Actualmente hay una gran cantidad de recursos en función de la identificación de todas las especies de mosquitos descritas hasta el momento, debido a la enorme cantidad de enfermedades que son capaces de transmitir, provocando aproximadamente un millón de muertes cada año. Se han planteado como meta la secuenciación de 2800 especies de las 3500 reconocidas (80%), en un periodo de dos años. (Anónimo, 2007).

Se han realizado estudios que demuestran, la eficacia del método para delimitar especies crípticas. Hebert *et al.* (2004a), concluyeron que la mariposa *Astraptes fulgerator* del noroeste de Costa Rica no es una sola especie como se pensaba según sus caracteres morfológicos y ecológicos sino, 10 especies crípticas. Otro ejemplo lo constituyen la especie *Belvosia parasitoid*, que realmente esta constituida por grupos de especies crípticas hospedero-específicas (Smith *et al.* 2006). Stahls y Savolainen (2008), revelan que *Baetis vernus* constituyen un grupo, no una sola especie. Igualmente Lambert *et al.* (2005) plantean la posibilidad de emplear esta metodología para evaluar la biodiversidad, incluso de especies ya extintas.

Una vez surgida la idea del código de barras del ADN se constituyó un consorcio internacional, *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), con participantes de museos de historia natural, herbarios, organizaciones de biodiversidad, etc. El objetivo principal de esta sociedad es la creación de una base de datos con el código de barras de ADN de todas las especies identificadas morfológicamente, además contendrá otras informaciones como



nombre científico, fotografías, número de catálogo, lugar de procedencia y otros datos de interés (Schindel, 2005). Existen conjuntamente cuatro grandes campañas dedicadas esencialmente a lepidóteros (All-Leps), peces (Fish-Bol), aves (ABBI) y a organismos árticos de Canadá (Canadian Artic).

### **1.1.2 Principales limitaciones del código de barras:**

Hasta el momento existen algunas limitantes que dificultan el uso extendido del código de barras de ADN, como por ejemplo:

- Grupos con poca diversidad en su secuencia de nucleótidos. Por esta razón, Hebert, *et.al*, (2003b) fueron incapaces de identificar caracteres para discriminar un pequeño grupo de corales y anémonas (phylum Cnidaria).
- Especies de divergencia reciente: En estos casos, los grupos incipientes comparten haplotipos; sin embargo, en casos como estos donde especies jóvenes no se diagnostiquen es posible llegar a la definición de la familia y género al cual pertenece la muestra (Stoeckle, 2003)
- Híbridos: con un solo gen es muy difícil identificar especies híbridas, para ello sería necesario el empleo de un conjunto de caracteres diagnósticos y el análisis de múltiples genes independientes de origen mitocondrial y nuclear (Barber y Boyce, 2006).
- Pseudogenes: Las copias inactivas de genes, como el COI, que han sido transferidas al genoma nuclear, muestran usualmente un gran número de mutaciones y/o deleciones, que pueden complicar las identificaciones o definitivamente conducir el análisis a resultados erróneos (Bensasson et al., 2001; Ballard y Whitlock, 2004).

### **1.1.3 Polémica actual sobre el código de barras de ADN.**

A pesar de las ventajas que puede presentar el uso del código de barras de ADN en la aceleración del proceso de inventariar la biodiversidad, este ha estado sujeto a fuertes críticas fundamentalmente por la comunidad de taxónomos. Estos plantean que es imposible llevar a cabo este proyecto basándose solamente en un fragmento de gen (Vences *et al.*, 2005; De Salle, 2006); contrariamente a esto existen un gran número de investigaciones que demuestran la coincidencia entre las especies identificadas por los métodos taxonómicos tradicionales y por el código de barras de ADN (Hebert *et.al*, 2003b; Hebert *et.al*, 2004b; Ward, *et.al*, 2005). Conjuntamente con esto coexiste otro grupo de

detractores que hacen énfasis en el inconveniente de establecer relaciones filogenéticas confiables con un solo gen como marcador. Brower (2006) refuta lo planteado por Hebert, *et al.* (2004a) en *Astrartes* (Lepidoptera). Es cierto que no es posible establecer relaciones con un solo gen pero este no es el objetivo del código de barras de ADN. En este sentido Hajibabaei *et al.* (2006a), concluye en un análisis con primates que un pequeño segmento de ADN no contiene información suficiente para establecer una filogenia o definir nuevas especies, sino que proporciona una etiqueta eficiente para asignar especímenes desconocidos a especies conocidas.

### 1.2. Marcadores moleculares.

El desarrollo de la biología molecular ha permitido la utilización de la información genética contenida en las macromoléculas (Proteínas y ADN) para estudiar numerosos aspectos de la historia y relaciones evolutivas de los organismos. La integración de los datos moleculares con información de la etología, ecología, morfología comparada, sistemática y paleontología permite dilucidar aspectos importantes de la historia de las especies (Avise, 1994).

Los caracteres moleculares constituyen otro de los caracteres taxonómicos cuyo estudio permite establecer precisamente relaciones entre organismos de igual o diferente categoría taxonómica. Entre las ventajas más importantes que presentan los caracteres moleculares podemos citar (Graur y Li, 2000):

- Son caracteres transmitidos genéticamente.
- Muchos genes son ubicuos y permiten estudiar las relaciones entre todas las formas de vida.
- Constituyen una fuente “ilimitada” de caracteres.
- Permiten realizar comparaciones a cualquier nivel de diferenciación genética.
- Su valor en los estudios comparativos es el mismo indistintamente del estadio de desarrollo de que se trate.
- Constituyen una fuente de datos alternativa cuando la ausencia de caracteres morfológicos o las homoplasias conducen a resultados controversiales.

### 1.2.1 ADN mitocondrial

Todos los eucariontes, con unas pocas excepciones, presentan en sus células gran cantidad de mitocondrias que funcionan como transductoras de energía, que poseen un genoma propio y que son sede de procesos de síntesis que garantizan su integridad y la de los complejos enzimáticos que participan en la fosforilación oxidativa y en la cadena de transporte electrónico (Avice *et al.*, 1987).

La molécula de ADNmt animal es circular, de doble cadena, covalentemente cerrada, excepcionalmente compacta con pocas o ninguna región intergénica y carece de intrones. Su talla varía desde aproximadamente 14 Kpb en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Okimoto *et al.*, 1992) hasta los 42 Kpb en el molusco *Placopecten magellanicus* (La Roche *et al.*, 1990). En la mayoría de los *taxa*, el ADNmt contiene los genes para las subunidades 12S y 16S del ARN ribosomal, 22 genes de ARN de transferencia y para 13 genes de las proteínas: citocromo b, las subunidades I, II y III del complejo citocromo oxidasa, las subunidades 6 y 8 del complejo ATPasa y las subunidades 1-6 y 4L del complejo NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria. Además tiene una región reguladora o de control de los procesos de replicación y transcripción. Debido a estas características las mitocondrias presentan su propio sistema de replicación, transcripción, procesamiento de ARN mensajeros y traducción de proteínas (Wolstenholme, 1992; Boore, 1999).

El ADNmt presenta algunas características que hacen que esta molécula haya sido muy utilizada tanto en estudios filogenéticos como poblacionales (Avice *et al.*, 1987):

- Herencia materna: los linajes matrilineales pueden ser seguidos a lo largo del tiempo
- Ausencia de recombinación: los linajes son unitarios, no hay mezcla de historias diferentes
- Homoplasmia: un solo tipo de molécula por organismo
- Tamaño efectivo pequeño: efecto más rápido de la deriva genética
- En muchos casos la evolución de la secuencia es relativamente rápida (en plantas no ocurre así).

Además de estas particularidades existen 4 razones fundamentales que hacen al genoma mitocondrial apropiado para la identificación de especies (Stoeckle *et al.*, 2005):

- Número de copias: Generalmente por cada célula existen dos copias del ADN nuclear, sin embargo hay de 100 a 10,000 genomas mitocondriales. Es más exitoso recuperar el ADNmt de muestras pequeñas o degradadas.
- Gran diferenciación entre especies: Generalmente la diferenciación entre especies animales relativamente cercanas es como promedio de 5 a 10 veces mayor en genes mitocondriales que en nucleares.
- Poca diferenciación intraespecífica: Esto puede ser un reflejo de la pérdida rápida de polimorfismo ancestral debido a la herencia materna o a un barrido selectivo (selective sweeps).
- Ausencia de intrones: En animales los genes mitocondriales en muy pocas ocasiones tienen intrones, por lo que la amplificación de estos genes es usualmente más simple que los genes nucleares.

### **1.2.2 La secuencia del gen citocromo oxidasa I (COI) como código de barras**

Para que una región sea práctica como código de barras de ADN debe cumplir con tres características esenciales (Kress y Erickson, 2008):

- I. Contener una variabilidad y divergencia genética significativa al nivel de especie.
- II. Poseer sitios flanqueantes conservados de manera tal que permita el desarrollo de oligonucleótidos universales.
- III. Tener un tamaño de secuencia relativamente corto de forma tal que sea fácil su extracción y amplificación.

El fragmento del gen mitocondrial que codifica para la proteína citocromo oxidasa I (COI) (650pb) fue el primero empleado como código de barras, y con gran aceptación en la comunidad científica (Hebert *et al.*, 2003 a,b; Hajibabaei *et al.*, 2006b; Triantafyllidis *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008). Las pruebas hechas hasta el momento en diferentes grupos demuestran que el fragmento de COI, puede ser útil y suficiente para proveer un código de cuatro letras e innumerables combinaciones para lograr la identificación de aproximadamente un 99% de las especies.

Se han propuesto otros genes como por ejemplo 16S para anfibios. Esto se debe a que se han presentado dificultades con las amplificaciones del gen COI, posiblemente por la presencia de mutaciones en la región de unión de los oligonucleótidos. Sin embargo,

Vences *et al.*, (2005) lo proponen como complementario. Algunos autores como Moura *et al.* (2008), también han usado el 16S para delimitar especies crípticas en cnidarios. Otros genes propuestos son el gen mitocondrial citocromo b, las subunidades pequeña y grande del ARN ribosomal nuclear (nSSU y 18S), los nucleares ITS, matK y trnH-psbA, siendo los dos últimos empleados fundamentalmente en plantas, donde el genoma mitocondrial es muy poco variable (Blaxter *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006; Lemera *et al.*, 2007; Newmaster *et al.*, 2007; Summerbell *et al.*, 2007).

### **1.3. Características generales y distribución de los peces dulceacuícolas de Cuba.**

La fauna cubana incluye 57 especies de peces de agua dulce, 23 de ellas endémicas. La mayoría de estos peces poseen una amplia tolerancia a los cambios de temperatura, salinidad y composición del agua, de ahí que se les denomine euribiónticos, lo que les permite no vivir de forma estricta en agua dulce. Actualmente algunas de estas especies están amenazadas por la contaminación y la introducción de peces foráneos, lo que ha hecho declinar sus poblaciones, de tal modo que en algunas localidades donde en el pasado fueron abundantes, hoy en día ya no existen. (Vergara, 1992; Vales *et al.*, 1998). Por otro lado, los estudios de poblaciones y comunidades en los ecosistemas naturales son muy escasos y no se conoce el estado de conservación de la mayoría de las especies en la actualidad.

La ictiofauna fluvial cubana presenta algunas características, que deben ser mencionadas para una mejor comprensión de estos peces:

- Por su origen filogenético, gran parte de peces dulceacuícolas de Cuba tienen una relación más estrecha con los peces presentes en América Central y en un número reducido de taxones (*Anguilla* y *Lucifuga*) no tienen un origen centroamericano. Debe recordarse, según la teoría del origen continental de nuestra fauna, que Cuba pudo recibir migraciones desde el norte y Centroamérica en mayor cantidad, mayor frecuencia y con mayor diversificación que el resto de las Antillas (Vergara, 1980).
- El mayor número de especies endémicas de las Antillas se encuentra entre Cuba y la Española, y es precisamente en estos países donde existe mayor diversidad de hábitats acuáticos. La alta tasa de endémicos puede ser atribuida no solo a la naturaleza insular, sino

también a la complejidad topográfica local y a la historia geológica (Burgess y Franz, 1989).

- Aunque los peces dulceacuícolas cubanos son de distinta edad absoluta, se considera su origen en el Oligoceno Superior; constituyen, por tanto, una ictiofauna de reciente formación. Sin embargo, muestra patrones claros de distribución y de segregación espacial entre especies simpáticas que sugieren mecanismos adaptativos bien establecidos (Rodríguez, 2007).

- La mayoría de los peces son carnívoros u omnívoros, con un predominio de la dieta carnívora. Sin embargo, se pueden señalar casos como el de *Limia*, género monoespecífico, cuya especie *L. vittata* muestra una alimentación fundamentalmente limnívora. Por otra parte, *Girardinus metallicus* aunque no come exclusivamente algas, está especializado en raspar material vegetal de las rocas y plantas acuáticas, sobre todo cuando convive con otras especies pequeñas (Rodríguez, 2007).

- Atendiendo a la estratificación que presenta la ictiofauna cubana, todo parece indicar que el número de géneros y especies presentes en nuestras aguas interiores se incrementó con la llegada de la familia Poeciliidae. Es evidente que los miembros de esta familia ejercen una fuerte presión competitiva contra las especies representantes de la Familia Cyprinodontidae, que son desplazadas hacia la periferia geográfica (agua salobre de la desembocadura de los ríos), exceptuando a las especies del género *Rivulus*, altamente especializadas. Todo esto se debe a que la familia Poeciliidae, se encuentra más diversificada, es de origen más reciente y posee un potencial reproductor más eficiente (ovovivíparo o vivíparo) (Vergara, 1980).

- A lo largo de toda la isla de Cuba se encuentran representantes de la ictiofauna dulceacuícola, siendo la región Occidental la de mayor diversidad (o al menos la mejor estudiada). Además en Cuba existen especies endémicas locales y regionales (Vergara, 1980).

- Todas las especies que forman la ictiofauna fluvial cubana son altamente tolerantes a los cambios de salinidad (Myers, 1938; Vergara, 1980).

### 1.3.1 Características generales en Cuba, de las familias estudiadas.

Nuestro país, como se mencionó anteriormente, presenta una elevada diversidad y un alto nivel de endemismo. Las especies endémicas de peces dulceacuícolas en Cuba se encuentran agrupadas en las familias Atherinidae, Bythitidae, Cichlidae, Fundulidae, Lepisosteidae, Poeciliidae y Rivulidae.

La familia Bythitidae es considerada un grupo monofilético, el cual está subdividido en dos subfamilias: Bythitinae y Bromosphycinae. Además está compuesta por 32 géneros y 96 especies. Los miembros de esta familia pueden vivir en aguas desde totalmente dulce hasta marinas. Son especies vivíparas, con fecundación interna, los machos presentan un apéndice genital externo que le sirve de órgano intromitente. Esta estructura ha sido muy útil para la definición de muchos géneros (Nielsen *et. al.*, 1999).

Cichlidae está representada en Cuba con dos especies, que por la talla que logran alcanzar, podrían utilizarse para la cría intensiva con fines alimentarios (Alayo, 1974; Vales *et al.*, 1998). Una de ellas es la conocida Biajaca (*Nandopsis tetracanthus*) y la otra se le conoce en el oriente del país como Joturo (*Nandopsis ramsdeni*). Independientemente de la distribución que presenten, estas especies no suelen ser muy abundantes en los lugares donde habitan.

La familia Poeciliidae, de forma original, en el Caribe está compuesta por 46 especies agrupadas en cinco géneros, es la que reúne a la mayor parte de los peces dulceacuícolas del área del Caribe (Burgess y Franz, 1989) y es sin lugar a dudas, la que se encuentra más representada en todo nuestro territorio nacional con cuatro géneros (Poey, 1854; Rivas, 1958; Alayo, 1974). Muchas de las especies habitan en agua dulce pero presentan amplia tolerancia a los cambios de salinidad, razón por la cual se les puede encontrar además en aguas salobres e incluso cerca de aguas costeras marinas y en lagunas de agua salada. La familia incluye algunos de los más diminutos y polimórficos vertebrados vivientes (Bussing, 2002). Con frecuencia muchas especies son utilizadas por el hombre en el control de insectos transmisores de enfermedades (García y Koldenkova, 1990). Se aprecia en esta familia un evidente dimorfismo sexual en los adultos. La aleta anal en el macho está modificada a modo de órgano intromitente conformando una estructura alargada denominada gonopodio. La formación de éste implica la transformación de los rayos tres al cinco de la aleta anal, así como modificación de todo el soporte interno de la misma

(Rodríguez, 1997). Este representa el elemento conductor de esperma que permite la fecundación interna de la hembra y constituye una estructura fundamental para la clasificación sistemática del grupo (Rivero y Rivas 1944; Rivas y Myers, 1950; Barus *et al.*, 1981; Franz y Burgess, 1983; Barus y Libosvársky, 1987; Bussing, 2002). La mayoría de los representantes de esta familia son vivíparos con un período de gestación que varía en las distintas especies entre cuatro y seis semanas (Damas, 1999). Los géneros mejor representados en Cuba son *Girardinus* y *Gambusia* (Rivas, 1944).

Lepisosteidae, es una familia que está constituida por dos géneros (*Lepisosteus* y *Atractosteus*), que se piensa que datan del Paleozoico, o sea de hace 180 millones de años. Su coraza de escamas ganoideas rómbicas, su cola heterocerca modificada, el hocico y mandíbulas prolongadas, su cuerpo alargado y cilíndrico con aletas dorsal y anal en posición posterior y la capacidad de respirar aire atmosférico son algunas de las características que presentan estos peces. Los lepisosteidos habitan ríos y canales con aguas tranquilas, además de lagunas temporales y lagos. Algunas especies entran en aguas salobres y a veces se encuentran en aguas costeras. Pueden alcanzar grandes tamaños, algunas especies llegan hasta tres metros de longitud (Suttkus, 1963; Bussing, 2002)

Otras familias representadas en Cuba son Rivulidae, Fundulidae y Atherinidae, las que se encuentran incluidas todas, al igual que Poeciliidae, dentro del orden Cyprinodontiformes. Aquí están agrupados aquellos peces que tienen una estrategia reproductiva diferente a los poecílicos. En este caso no existe cópula ni viviparidad; sino que todas estas especies presentan fecundación externa y son ovíparas. Los peces que forman parte de estas familias se les encuentra asociados a cuerpos de agua dulce, sin embargo, algunas especies también presentan gran plasticidad, soportando notables variaciones de salinidad y temperatura en el medio donde habitan (Alayo, 1974). Se caracterizan por su tamaño pequeño (2 a 11cm de longitud) y por tener un cuerpo cilíndrico con la cabeza algo achatada dorsalmente. Su alimentación se compone básicamente de algas, insectos y de otros pequeños invertebrados. Las diferencias sexuales en estos peces son más evidentes en los patrones de coloración de ambos sexos, siendo el macho de manera general, mucho más colorido que la hembra (Rivero, 1951). Estos peces son ovíparos, pudiendo subsistir, en el caso de *Rivulus* y *Cubanichtys*, en reservorios de agua temporales gracias a la capacidad que tienen sus



huevos de soportar períodos de desecación, de modo que aunque mueran los adultos, las poblaciones se reestablecen al llegar las lluvias (Koldenkova y García, 1987).

### 1.3.2 Distribución de las especies en estudio.

La familia Poeciliidae, como se ha mencionado anteriormente, es la de mayor diversidad y la más distribuida en el país. *Gambusia puncticulata* es la especie de esta familia más abundante, encontrándose prácticamente a lo largo de toda la isla (Rauchenberger, 1989), además de estar reportada para Jamaica y en Islas Caimán (Lucinda, 2003). Relacionadas con esta, han sido descritas otras especies o subespecies que pueden constituir endémicos locales ((Rosen y Bailey 1963; Rauchenberger 1989). *Gambusia punctata* es endémica de Cuba e igualmente muestra una amplia distribución por toda la isla (Lee *et al.*, 1983). Sin embargo, *Gambusia rhizophorae* presenta una distribución más restringida en el Norte de las provincias habaneras y en el sureste de la Florida (Robin y Ray, 1986). Esta especie es reconocida solo de localidades costeras, en particular desembocaduras de ríos, donde las salinidades son elevadas. En el caso del género *Girardinus*, su distribución aunque amplia, muestra una fragmentación más importante en los rangos de distribución de las diferentes especies que lo constituyen. *Girardinus creolus* que es endémico de la región Occidental de Cuba, específicamente se encuentra en algunas localidades del sur de la Sierra de los Órganos, en Pinar del Río, igualmente sucede con *Girardinus cubensis* y *Girardinus uninotatus*, aunque esta última también aparece en localidades de la cuenca norte (Lee *et al.*, 1983). *Girardinus falcatus* es más abundante en la región Occidental incluyendo la Isla de la Juventud, aunque también se le puede encontrar en el centro del país. *Girardinus microdactylus* se distribuye en algunas localidades de Pinar del Río y en la Isla de la Juventud. Por su parte, *Girardinus denticulatus*, es típica de la región Central y aparece también en algunos ríos de la región Oriental. Finalmente, *Girardinus metallicus* es la especie del género que se distribuye a través de todo el país, aunque no se ha encontrado en la región de Camagüey (Lee *et al.*, 1983). La especie *Quintana atrizona*, única representante de este género, endémica y considerada como grupo hermano de *Girardinus*, se localiza en solo algunos ríos de la Isla de la Juventud (Lee *et al.*, 1983). *Limia vittata* es la única representante, y endémica, del género en Cuba, se encuentra distribuida por todo el país. De la familia Cyprinodontidae, *Cubanichthys cubensis*, es endémica de Cuba y se distribuye hacia el oeste del país y en la Isla de la Juventud, y

*Cyprinodon variegatus* se encuentra distribuida desde Norte América hasta Venezuela, incluyendo las Antillas (Page y Burr, 1991). La familia Rivulidae cuenta con dos representantes en Cuba. *Rivulus cylindraceus*, es la de mayor rango de distribución, pues parece estar distribuida por toda Cuba (Lee *et al.*, 1983). Por el contrario, *Rivulus insulaepinorum*, es endémica de la Isla de la Juventud (de la Cruz y Dubitsky, 1976). En una situación similar aparecen las dos especies endémicas de la familia Cichlidae, *Nandopsis tetracanthus* y *Nandopsis ramsdeni*. La primera es pancubana mientras que la segunda solo se encuentra en los ríos Guaso y Yateras en el Oriente cubano. En la familia Bythitidae, *Lucifuga dentata* y *Lucifuga subterranea* son las que muestran un rango más amplio de distribución. *L. dentata* habita las aguas freáticas de las cavernas del sistema cársico centro-occidental, desde Matanzas hasta la Península de Guanahacabibes, mientras que *L. subterranea* comparte con la anterior localidades de La Habana (García-Debrás *et al.*, 1999). El único miembro representado de la familia Lepisosteidae, *Atractosteus tristoechus*, se encuentra en la Ciénaga de Zapata, Matanzas y en la Isla de la Juventud (Lee *et al.*, 1983). Finalmente, de la familia Atherinidae, *Alepidomus evermanni*, se localiza en el oeste de Cuba.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Clasificación taxonómica**

En el Anexo 1 se muestra la clasificación taxonómica de las especies en estudio. En el caso de *Cyprinodon* los ejemplares colectados se identificaron como pertenecientes a la especie *Cyprinodon variegatus*. Se hace esta salvedad debido a que Echelle *et al.* (2005) plantea la posibilidad de que en Cuba existan dos nuevas especies del complejo *Cyprinodon variegatus*.

Fueron designados como *Gambusia* sp los individuos de Cayo Coco que comparten algunos caracteres morfológicos y de hábitat (agua salada) con *Gambusia rhizophorae*, pero muestran diferencias en algunas proporciones y en la forma general del cuerpo. Igualmente, se asignó a *G. rhizophorae* un ejemplar capturado en Río Yara, que constituiría, de verificarse, el primer reporte de esta especie para el este cubano y para un ambiente completamente de agua dulce.

### **2.2. Material biológico**

Para este estudio fueron colectados ejemplares hembras y machos de 24 especies pertenecientes a 11 géneros de peces dulceacuícolas cubanos. Todos los individuos fueron capturados con jamos o trasmallos en acuatorios de diferentes regiones del país, tratando de abarcar un amplio rango de la distribución conocida de cada especie (Figura 1 y Anexo2).

Los ejemplares capturados fueron conservados vivos hasta su arribo al laboratorio o directamente conservados en etanol al 90%. En todos los casos se tomaron fotos y se identificaron las especies sobre la base de los caracteres morfológicos propuestos por las descripciones originales. A cada animal se le asignó un número de catálogo de la colección de peces del Museo de Historia Natural Felipe Poey (Anexo 2). Además se incluyeron 10 secuencias procedentes de la base de datos del Genbank, con el objetivo de usarlas como material comparativo y de validación en algunos casos. Las secuencias incluidas fueron de *Gambusia affinis* (Nº de acceso NC004388), *Nandopsis tetracanthus* (Nº de acceso DQ119212), *Nandopsis ramsdeni* (Nº de acceso DQ119211), *Nandopsis haitiensis* (Nº de acceso DQ119213), *Nandopsis managuensis* (Nº de acceso DQ119203), *Cubanichtys pengelleyi* (Nº de acceso AY356593), *Kryptolebias marmoratus* (Nº de acceso AF283503), *Atractosteus spatula* (Nº de acceso NC 008131), *Lepisosteus oculatus* (Nº de acceso NC 004744) y *Lepisosteus osseus* (Nº de acceso NC 008104).

### **2.3. Análisis del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI)**

#### **2.3.1 Obtención del ADN total.**

Se tomó un fragmento de músculo de cada uno de los individuos. El ADN total se obtuvo siguiendo el protocolo de extracción de QIAGEN: para ello se tomaron aproximadamente 25mg de tejido de músculo fijados en etanol, el cual se secó con papel de filtrado para eliminar el exceso de etanol y se fragmentó para facilitar la digestión. Se añadieron 180  $\mu$ L de tampón ATL y 20  $\mu$ L de proteasa K, y seguido de un breve mezclado con vortex se incubó a 55 °C hasta que el tejido estuvo completamente digerido. Posteriormente se mezcló con vortex por 15seg y se añadieron 200  $\mu$ L de tampón AL y 200  $\mu$ L de etanol (96-100%), seguido nuevamente de agitación. Se pasó toda la mezcla anterior a una columna colocada en un tubo colector de 2mL y se centrifugó a 11000g por 1min, luego se desechó el tubo colector y la columna se colocó en un nuevo tubo colector, seguidamente se añadió 500  $\mu$ L de tampón AW1 y se centrifugó a 11000g por 1min, se eliminó el tubo colector y la columna se ubicó en uno nuevo, se añadió 500  $\mu$ L de tampón AW2 y se centrifugó a 12000g durante 3min, se desechó el tubo colector una vez más y la columna se puso en un tubo de 1,5mL ó 2mL, se añadieron 100  $\mu$ L de tampón AE directamente en la membrana, se incubó a temperatura ambiente por 1min y luego se centrifugó a 11000g durante 1min para colectar el ADN diluido.

#### **2.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación.**

Se amplificó un fragmento de 650pb de la región 5' del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), para ello los oligonucleótidos utilizados fueron:

Fish COIf: 5' AAYCAYAAAGAYGGYACCT; Fish COIr: 5' CTTCNGGRTGNCCRAA  
GAAYCA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se llevó a cabo de la manera siguiente:

Para 50 $\mu$ L de volumen final, se tomó 1 $\mu$ L de la solución de ADN total, 1/10 del volumen final de reacción de tampón de amplificación 10X (Promega), 200 $\mu$ M de dNTPs, 200 $\mu$ M de de cada uno de los oligonucleótidos, 1.5mM de MgCL<sub>2</sub> y una unidad de GoTaq polimerasa (Promega).

El programa utilizado fue el siguiente: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5min, luego 34 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 45seg, hibridación de los

cebadores a las cadenas molde a 48°C por 45seg, extensión de las cadenas a 72°C por 1min y 30 seg y un paso final de extensión a 72°C durante 10min.

Los productos del PCR fueron purificados mediante el protocolo de NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel): primeramente se mezcló un volumen de muestra con dos volúmenes de tampón NT, luego se pasó la mezcla anterior a una columna colocada en un tubo colector de 2mL y se centrifugó a 11000g por 1min. A continuación se desechó el tubo colector y la columna se colocó en un nuevo tubo colector. Posteriormente se añadieron 600µL de tampón NT3, se centrifugó a 11000g por 1min, y se desechó el tubo colector y la columna se puso en un nuevo tubo colector. Luego, se centrifugó por 2min a 11000g con el objetivo de remover el tampón NT3. Por último se ubicó en un tubo de 1,5mL y se añadieron 15-50 µL del tampón NE, se incubó a temperatura ambiente por 1min y posteriormente se centrifugó a 11000g por 1min.

Las secuencias se obtuvieron con un Kit de secuenciación cíclica BigDye terminador sequencing ready reaction V.3 (Applied Biosystems), en un secuenciador automático, empleando los cebadores descritos anteriormente. El programa de amplificación de las secuencias fue el siguiente: 24 ciclos con 30seg de desnaturalización a 96°C, 60seg de hibridación a 48°C y extensión de las cadenas por 4min a 60°C.

### 2.4. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999).

Con el programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004), se calculó la distancia Kimura 2 parámetros (K2P) (Kimura, 1980) que permite corregir los sesgos en la proporción de cambios transversionales y transicionales, cuya fórmula es

$$K2P: D = -1/2 \ln(1-2P-Q) - 1/4 \ln(1-2Q)$$

siendo, P: frecuencia total de pares de transiciones.

Q: frecuencia total de pares de transversiones.

Los errores estándares de las distancias calculadas fueron estimados mediante bootstrap (1000 réplicas) (Felsenstein, 1981).

Se construyó un árbol por el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), utilizando las distancias K2P (Kimura, 1980). Con el objetivo de proveer una representación gráfica de la divergencia entre las especies. Aunque el número de caracteres taxonómicos es limitado para establecer relaciones entre grupos de divergencia evolutiva lejana, se estimó la robustez de los nodos a nivel intragenérico mediante 1000 réplicas de bootstrap.

Se realizó el Análisis de Agregación Poblacional (PAA) (Davis y Nixon, 1992) en tres de los géneros en estudio: *Gambusia*, *Girardinus* y *Rivulus*, para ello se tuvo en cuenta los sitios nucleotídicos polimórficos en cada uno de estos géneros.

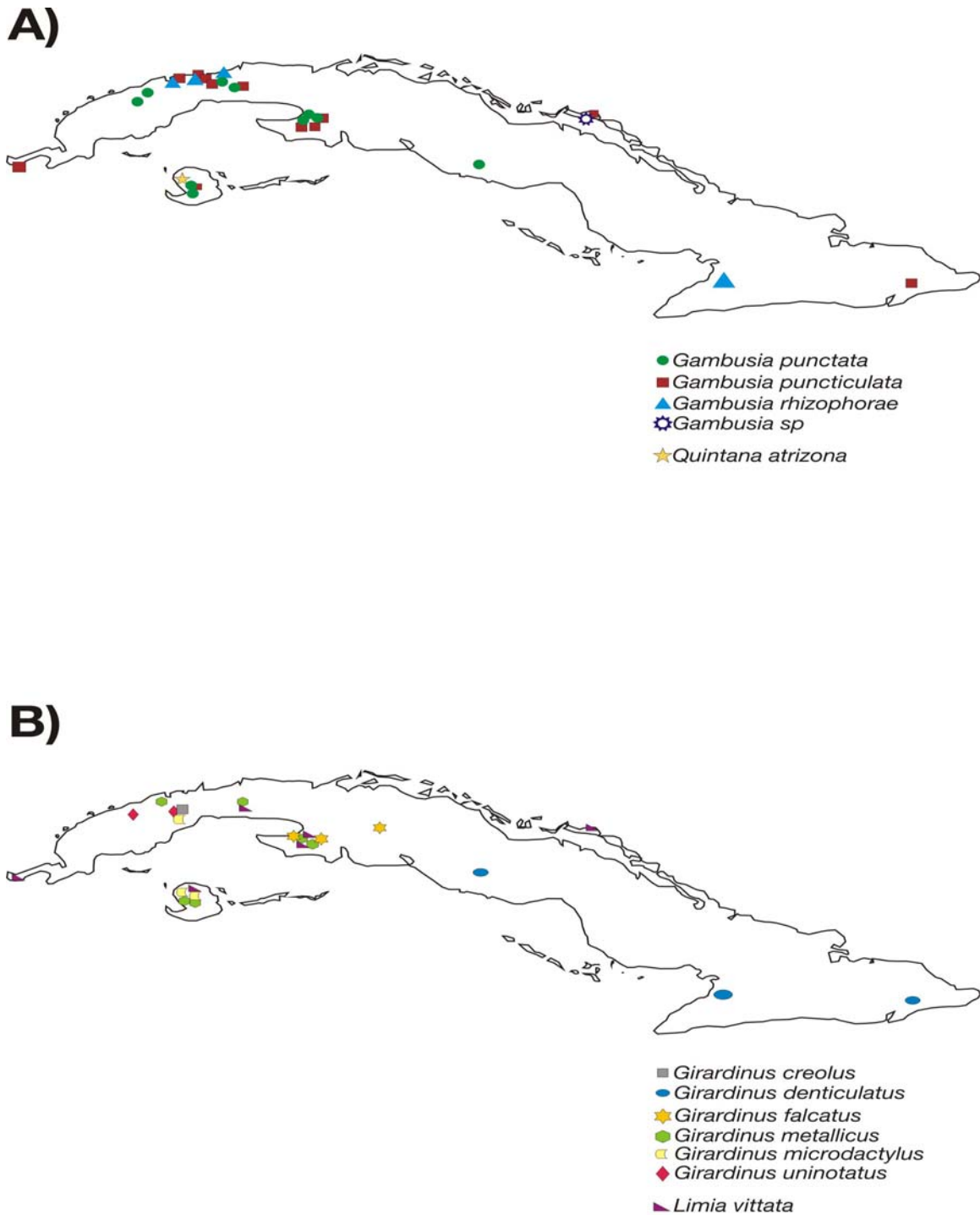
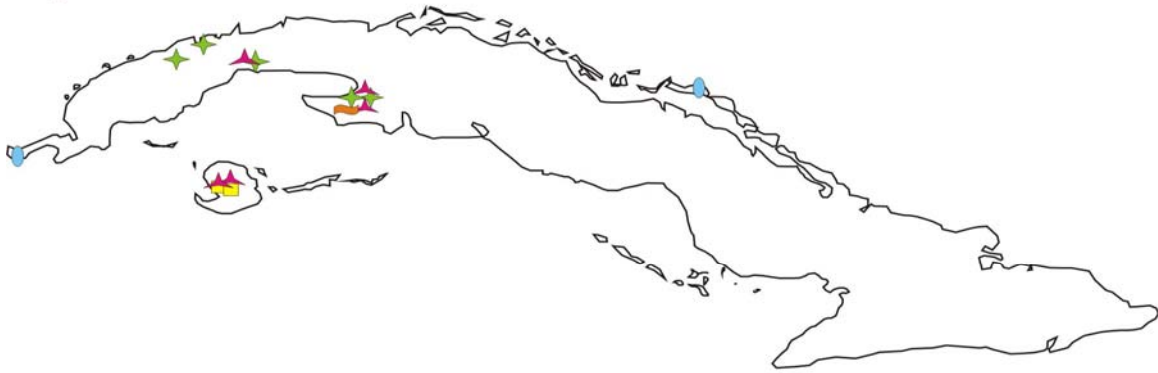


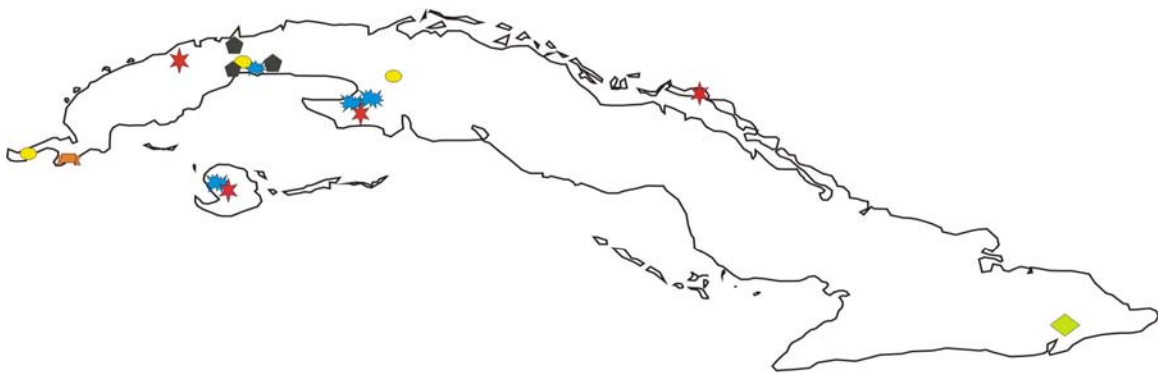
Figura 1. Sitios de muestreo de las especies en estudio. A) Especies de los géneros *Gambusia* y *Quintana*. B) Especies de los géneros *Girardinus* y *Limia*. C) Especies de los géneros *Atractosteus*, *Cubanichtys*, *Cyprinodon* y *Rivulus*. D) Especies de los géneros *Alepidomus*, *Lucifuga* y *Nandopsis*.

C)



- ▲— *Atractosteus tristoechus*
- ▲— *Cubanichtys cubensis*
- *Cyprinodon variegatus*
- ★— *Rivulus cylindraceus*
- *Rivulus insulaepinorum*

D)



- ★— *Alepidomus evermanni*
- *Lucifuga dentata*
- ▲— *Lucifuga n. sp*
- *Lucifuga subterranea*
- ◆— *Nandopsis ramsdeni*
- ★— *Nandopsis tetracanthus*

Figura 1 (continuación).



### **3. Resultados**

Las 24 especies en estudio, distribuidas en 11 géneros y siete familias, fueron amplificadas con total éxito con los oligonucleótidos diseñados para este trabajo, obteniéndose 96 secuencias nucleotídicas del gen COI. Esto representa un 69.6% de la ictiofauna dulceacuícola endémica de Cuba. Además fueron incluidas 10 secuencias de especies cubanas o afines, las cuales fueron tomadas de GeneBank.

Las secuencias del gen COI obtenidas tuvieron una longitud de 652pb y como en la mayoría de los estudios realizados, no se observaron diferencias de longitud para ninguno de los *taxa* analizados. En este estudio las secuencias comienzan en el nucleótido 6452 con respecto a la secuencia de la carpa (*Cyprinus carpio*) (Chang *et al.*, 1994) y corresponden a la región 5' del gen.

#### **3.1. Identificación de las especies sobre la base de estimados de divergencia.**

Las comparaciones entre las secuencias, utilizando la distancia Kimura 2 parámetros (K2P) y tomando al criterio de un 3% de divergencia evolutiva para distinguir las especies hermanas entre sí (Hebert *et al.*, 2003a), coincidió en un 96% con la identificación de las unidades taxonómicas reconocidas actualmente e incluidas en este trabajo.

La media de la distancia K2P de individuos coespecíficos fue de 0.96% comparada con un 10.18% para especies congénéricas; de ahí que la diferencia entre especies de un mismo género fue 10.6 veces superior a lo encontrado entre individuos pertenecientes a una misma especie. No obstante, existe cierto grado de solapamiento de los valores de distancias, debido a que el rango de distribución de las distancias K2P intraespecífica osciló entre 0 y 3.3% y el intragenérico entre 1.6 y 18.13%. Este resultado se debe a que se encontraron valores elevados de divergencia entre algunos individuos coespecíficos y valores relativamente pequeños entre especies hermanas de un mismo género. Este aspecto será retomado más adelante.

En el árbol construido por el método Neighbor-Joining (NJ) de manera general se observó que los géneros y especies en estudio se agruparon según su definición a priori (Figura 2).

##### **3.1.1 Géneros y especies identificadas de manera inequívoca**

De las dos especies del género *Nandopsis* en estudio *Nandopsis tetracanthus* fue la más variable, presentando valores de distancia intraespecífica entre 0 y 0.4%, Esta es la especie

más distribuida, encontrándose en todo el país, e incluso, fue observada por primera vez en este trabajo en ambiente salobre, en una localidad de la cayería Jardines del Rey. Por el contrario, *Nandopsis ramsdeni*, que es un endémico local, no mostró variación entre las secuencias analizadas. A nivel interespecífico, estas dos especies cubanas mostraron un menor nivel de divergencia en el COI ( $3.6 \pm 0.8\%$ ), respecto a lo observado en las comparaciones con las especies foráneas incluidas en el análisis, *Nandopsis haitiensis* y *Nandopsis managuensis*, cuyos valores oscilan entre 11.1 y 14.7% (Tabla 1; Figura 2)

Tabla 1. Distancias genéticas entre las especies en estudio del género *Nandopsis*, estimadas por K2P (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima los errores estándares de las mismas

	<i>N. tetracanthus</i>	<i>N. ramsdeni</i>	<i>N. haitiensis</i>	<i>N. managuensis</i>
<i>N. tetracanthus</i>		0.008	0.015	0.017
<i>N. ramsdeni</i>	<b>0.036</b>		0.016	0.018
<i>N. haitiensis</i>	<b>0.111</b>	<b>0.121</b>		0.017
<i>N. managuensis</i>	<b>0.139</b>	<b>0.147</b>	<b>0.138</b>	

Del género *Lucifuga* no se incluyeron en el estudio las especies *Lucifuga simile* y *Lucifuga teresinarum*. En el primer caso no se contó con material adecuado para las amplificaciones y en el segundo la especie se encuentra actualmente bajo revisión. Los mayores valores de diferenciación intraespecífica, se encontraron en *Lucifuga dentata* que oscilan entre 0.15 y 0.46%. A nivel interespecífico la menor divergencia se presenta entre *Lucifuga subterranea* y *Lucifuga* n.sp. (García-Machado *et al.*, en preparación) ( $10.8 \pm 1.4\%$ ), siendo los valores entre *L. dentata* - *L. subterranea* y *L. dentata* - *Lucifuga* n.sp ligeramente superiores (11.1% y 11.5%, respectivamente) (Tabla 2; Figura 2).

Tabla 2. Distancias genéticas entre las especies en estudio del género *Lucifuga*, estimadas por K2P (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima, los errores estándares de las mismas.

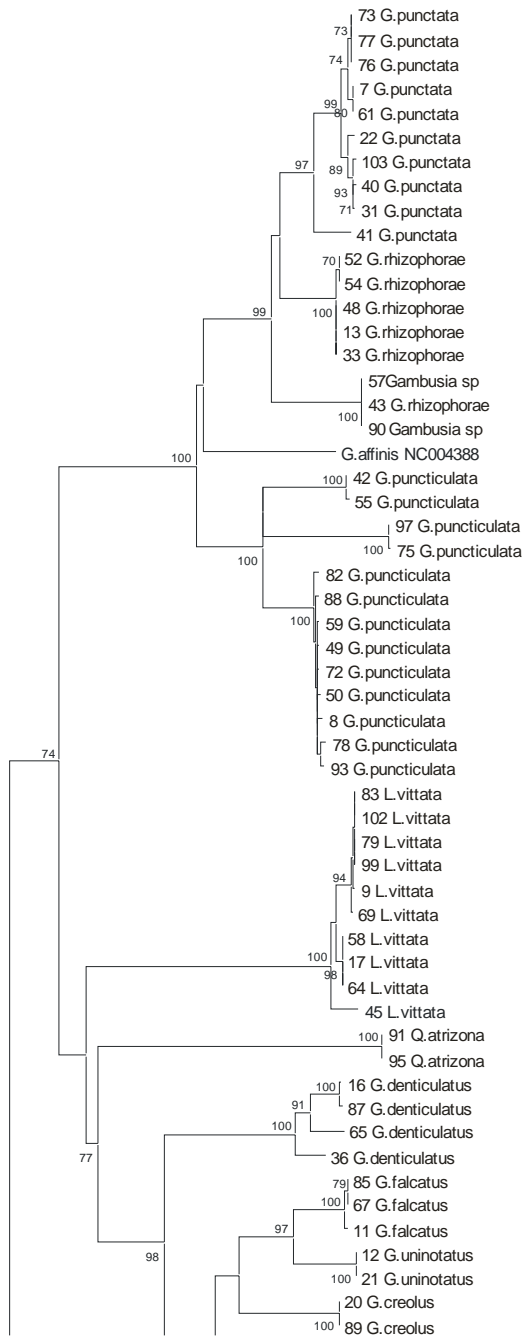
	<i>L. dentata</i>	<i>Lucifuga nsp</i>	<i>L. subterranea</i>
<i>L. dentata</i>		0.014	0.014
<i>Lucifuga n.sp.</i>	<b>0.111</b>		0.014
<i>L. subterranea</i>	<b>0.115</b>	<b>0.108</b>	

*Girardinus* es el género de los estudiados que presenta mayor número de especies descritas hasta la fecha (siete). De ellas fueron estudiadas seis, resultando en todos los casos congruentes la clasificación basada en los caracteres morfológicos, con respecto a los datos moleculares. Las secuencias de *G. creolus*, procedentes de una única localidad, fueron idénticas, mientras que la de mayor divergencia intraespecífica la mostró *G. denticulatus*, con  $2.3 \pm 0.4$  %. La divergencia entre las especies del género se extendió desde un  $4.2 \pm 0.8$  % encontrado entre *G. falcatus* y *G. uninotatus* hasta  $14.6 \pm 1.7$  % entre *G. falcatus* y *G. denticulatus* (Tabla 3; Figura 2).

De cuatro géneros, que solo presentan una especie representada en Cuba, o son monoespecíficos, se obtuvieron los valores de divergencia intraespecífica, mientras que para un quinto, se realizaron comparaciones intragenéricas e intergenéricas empleando las secuencias informadas en GeneBank. Entran en el primer caso, *Alepidomus evermanni* con  $0.42 \pm 0.19$  %, *Limia vittata*,  $0.91 \pm 0.25$  %, *Quintana atrizona* 0% (en este caso procedente de una única localidad en Isla de la Juventud) y *Cyprinodon variegatus* con  $1.46 \pm 0.53$  %. En el segundo caso se encuentra *Atractosteus tristoechus* que diverge de *Atractosteus spatula* por solo  $1.6 \pm 0.4$  %, no obstante se pudo observar que la divergencia entre *Lepisosteus oculatus* y *Lepisosteus osseus*, pertenecientes también a la familia Lepisosteidae, fue aun más pequeña ( $0.9 \pm 0.3$ %). La divergencia intergenérica es de  $12.6 \pm 2.5$  %.

Tabla 3. Distancias genéticas entre las especies en estudio del género *Girardinus*, estimadas por K2P (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima, los errores estándares de las mismas.

	<i>G. metallicus</i>	<i>G. microdactylus</i>	<i>G. falcatus</i>	<i>G. uninotatus</i>	<i>G. denticulatus</i>	<i>G. creolus</i>
<i>G. metallicus</i>		0.010	0.014	0.013	0.016	0.012
<i>G. microdactylus</i>	<b>0.067</b>		0.014	0.012	0.016	0.012
<i>G. falcatus</i>	<b>0.113</b>	<b>0.110</b>		0.008	0.017	0.012
<i>G. uninotatus</i>	<b>0.098</b>	<b>0.092</b>	<b>0.042</b>		0.016	0.011
<i>G. denticulatus</i>	<b>0.135</b>	<b>0.137</b>	<b>0.146</b>	<b>0.141</b>		0.014
<i>G. creolus</i>	<b>0.081</b>	<b>0.080</b>	<b>0.081</b>	<b>0.069</b>	<b>0.117</b>	



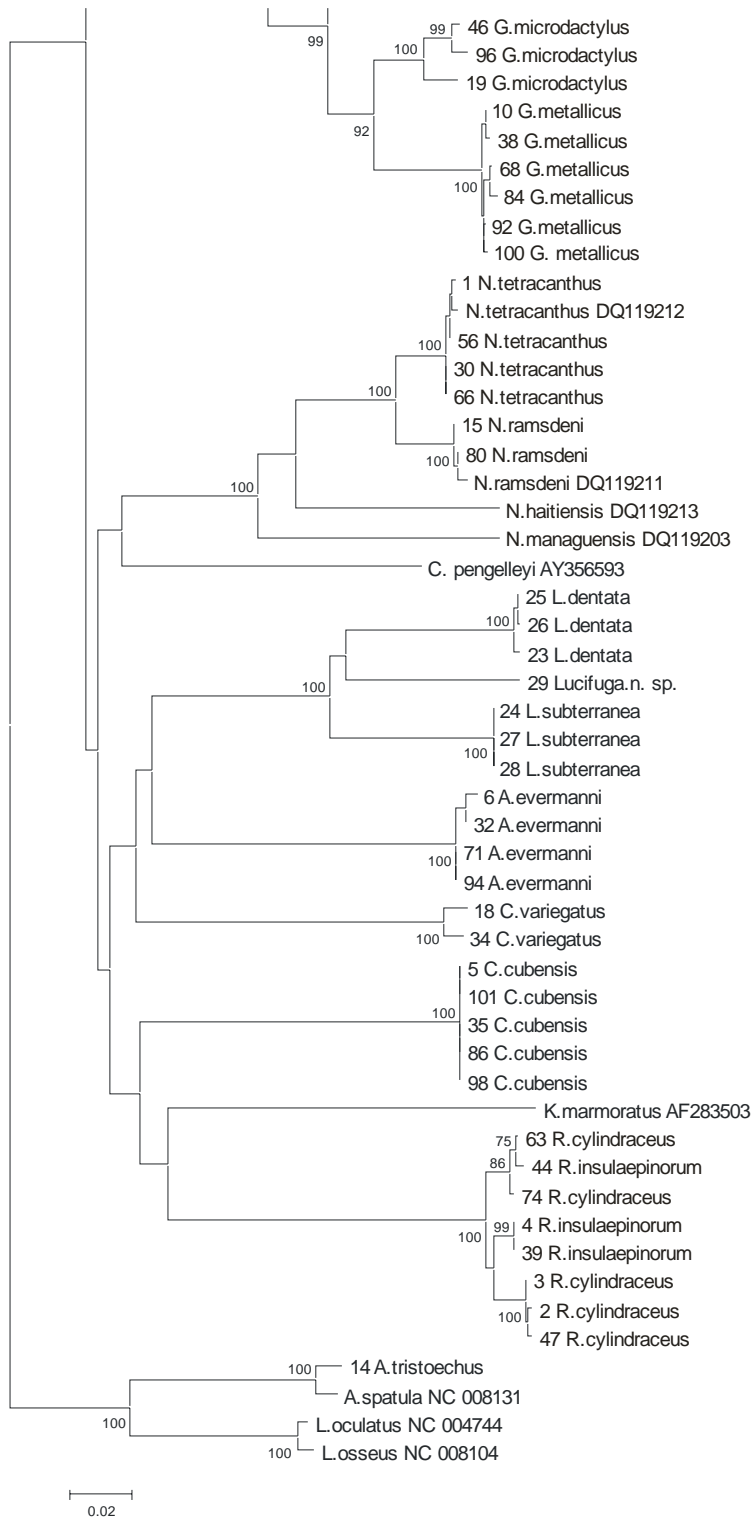


Figura 2. Árbol construido por el método de Neighbor-Joining, utilizando las distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980), para todas las especies analizadas, basado en la secuencia parcial del gen COI. Los números sobre las ramas representan los valores de robustez de los nodos mayores del 70%, estimados por bootstrap con 1000 réplicas

### 3.1.2 Géneros y especies que muestran incongruencias en la identificación.

#### 3.1.2.1 Género *Gambusia*

En el caso de *Gambusia* fueron analizadas tres especies cubanas reconocidas más los individuos clasificados como *Gambusia* sp y además se incluyó una secuencia de la especie *Gambusia affinis* procedente del GeneBank. Los menores valores de divergencia genética se encontraron entre *Gambusia punctata* - *Gambusia rhizophorae* ( $5.0 \pm 0.8$  %) y entre *Gambusia rhizophorae*- *Gambusia* sp ( $5.1 \pm 0.8$  %). Entre las restantes especies los valores fueron superiores oscilando entre 6.3 y 12.6% (Tabla 4). A nivel intraespecífico la media de la distancia genética para *G. punctata*, fue de  $1.0 \pm 0.2$  % y para *G. rhizophorae* de  $2.1 \pm 0.3$ %, sin embargo *G. puncticulata* mostró un valor de divergencia que se encuentra alrededor del límite del 3% ( $3.3 \pm 0.6$  %).

Tabla 4. Distancias genéticas entre las especies en estudio del género *Gambusia*, estimadas por K2P (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima, los errores estándares de las mismas.

	<i>G. punctata</i>	<i>G. rhizophorae</i>	<i>Gambusia</i> sp	<i>G. puncticulata</i>	<i>G. affinis</i>
<i>G. punctata</i>		0.008	0.010	0.013	0.013
<i>G. rhizophorae</i>	<b>0.050</b>		0.008	0.012	0.013
<i>Gambusia</i> sp	<b>0.063</b>	<b>0.051</b>		0.013	0.014
<i>G. puncticulata</i>	<b>0.112</b>	<b>0.106</b>	<b>0.117</b>		0.014
<i>G. affinis</i>	<b>0.107</b>	<b>0.102</b>	<b>0.116</b>	<b>0.126</b>	

El agrupamiento observado en el árbol NJ (Figura 2) muestra que uno de los individuos de *G. rhizophorae*, el ejemplar capturado en Río Yara (Granma) se encuentra en el mismo clado de los animales nombrados como *Gambusia* sp, y que *G. puncticulata sensu lato* presenta grupos discretos dentro del mismo clado. En este sentido, se realizó un reagrupamiento en subunidades siguiendo el patrón observado y se recalcularon los niveles de divergencia. Se observó que el menor valor de divergencia genética fue de  $4.8 \pm 0.9$  % y se presenta entre *G. punctata* - *G. rhizophorae* (A) (grupo constituido por los individuos 13, 33, 48, 52 y 54) y entre *G. puncticulata* (A) (compuesto por los individuos 8, 49, 50, 78, 88, 93, 59 y 72) y *G. puncticulata* (B) (formado por los individuos 55 y 42). A pesar de que este valor de divergencia es el más pequeño encontrada dentro del género, esta última es elevada a nivel coespecífico, superando el umbral del 3%. Aun más significativos son los

valores que se presentan entre *G. rhizophorae* (A) y *G. rhizophorae* (B) + *Gambusia* sp [este último formado por los individuos 43(*G. rhizophorae*) y *Gambusia* sp (57 y 90)] ( $6.1 \pm 1.0$  %); *G. puncticulata* (A) y *G. puncticulata* (C) (formado este por los ejemplares 75 y 97) ( $7.3 \pm 1.0$  %) y entre *G. puncticulata* (B) y *G. puncticulata* (C), en ambos casos de  $8.1 \pm 1.1$  % (Tabla 5).

### 3.1.2.2 Género *Rivulus*

En el género *Rivulus* se analizaron las dos especies presentes en Cuba *R. cylindraceus* y *R. insulaepinorum*, entre las cuales se observó un bajo valor de divergencia genética:  $1.7 \pm 0.4$  %. Sin embargo, a nivel intraespecífico, *R. cylindraceus* muestra una distancia genética muy similar a la que se encuentra a nivel interespecífico para este género,  $1.9\% \pm 0.3$ . Al analizar el diagrama (Figura 2) se observa que ambas especies no se definen como grupos monofiléticos recíprocos, en particular, uno de los haplotipos identificados en *R. insulaepinorum* es muy similar a los de *R. cylindraceus* de Matanzas.

Los dos subclados de *R. cylindraceus* (A) (grupo formado por los individuos identificados como 2, 3 y 47) y (B) (constituido este por los ejemplares 63 y 74), divergen uno del otro en  $2.9 \pm 0.6$  %, valor ligeramente superior al encontrado entre las dos especies según la clasificación taxonómica actual. Entre *R. cylindraceus* (A) y *R. insulaepinorum* es de  $2.0\%$  y para *R. cylindraceus* (B) y *R. insulaepinorum* la distancia genética es de solo  $1.3 \pm 0.4$  %.

### 3.1.2.3 Género *Cubanichtys*

*Cubanichtys* es otro de los géneros con solo una especie en Cuba, *C. cubensis*, mientras que existe una segunda especie *C. pengelleyi* que fue descrita para Jamaica. Se evaluó la distancia genética entre ambas a partir de una secuencia informada en la base de datos GeneBank, encontrándose que entre ellas el nivel de divergencia ( $18.13\% \pm 1.88$ ) sobrepasa todos los observados en este estudio para comparaciones intragenéricas.



Tabla 5. Distancias genéticas entre las especies y grupos en estudio del género *Gambusia*, estimadas por K2P (Kimura, 1980). Debajo de la diagonal, en negrita, se muestran los valores de distancias y encima, los errores estándares de las mismas.

	<i>G.punctata</i>	<i>G.rhizophorae</i> (A)	<i>G.rhizophorae</i> (B)+sp	<i>G.puncticulata</i> (A)	<i>G.puncticulata</i> (B)	<i>G.puncticulata</i> (C)	<i>G.affinis</i>
<i>G.punctata</i>		0.009	0.010	0.014	0.017	0.009	0.013
<i>G.rhizophorae</i> (A)	<b>0.048</b>		0.010	0.013	0.013	0.016	0.013
<i>G. rhizophorae</i> (B) + <i>Gambusia</i> sp	<b>0.063</b>	<b>0.061</b>		0.014	0.017	0.017	0.015
<i>G.puncticulata</i> (A)	<b>0.104</b>	<b>0.096</b>	<b>0.108</b>		0.009	0.010	0.015
<i>G.puncticulata</i> (B)	<b>0.124</b>	<b>0.103</b>	<b>0.133</b>	<b>0.048</b>		0.011	0.016
<i>G.puncticulata</i> (C)	<b>0.137</b>	<b>0.139</b>	<b>0.140</b>	<b>0.073</b>	<b>0.081</b>		0.016
<i>G.affinis</i>	<b>0.107</b>	<b>0.099</b>	<b>0.116</b>	<b>0.120</b>	<b>0.127</b>	<b>0.150</b>	

### 3.2. Identificación de las especies sobre la base del análisis de caracteres nucleotídicos

Se realizó un análisis de agregación poblacional (PAA) (Davis y Nixon 1992) en los géneros estudiados que presentan una mayor diversidad de especies o que mostraron incongruencias en el análisis de distancias. Estos son los casos de *Girardinus*, *Gambusia* y *Rivulus*.

#### 3.2.1 Género *Gambusia*

*Gambusia* presentó un total de 129 sitios variables, de ellos, considerando las designaciones taxonómicas sobre base morfológica, cuatro fueron sitios diagnósticos que identifican a *G. punctata*, uno a *G. rhizophorae* y 26 a *G. puncticulata*, mostrando una separación clara de esta última especie, respecto a las otras dos. *Gambusia* sp no presentó ningún sitio diagnóstico. Sin embargo, al hacer un agrupamiento de las secuencias de acuerdo con los caracteres que comparten, se identificaron tres grupos en *G. puncticulata*, los cuales coincidieron con los encontrados en el análisis de las distancias genéticas (Tabla 6) *G. puncticulata* (A) cuyos individuos tienen una distribución geográfica más amplia, abarca localidades de La Habana, Ciudad de la Habana, Matanzas y Guantánamo, se diferencia del resto por cinco sitios diagnósticos. *G. puncticulata* (B) cuyos individuos corresponden a una localidad de Guanahacabibes y otra de Baracoa (La Habana), se distinguieron por 17 sitios de los restantes miembros de *Gambusia*. El tercer grupo *G. puncticulata* (C) que se encuentra en Cayo Coco, se identificará por 10 sitios que les son únicos dentro del género. En el caso de *G. rhizophorae* se observaron dos grupos que igualmente concuerdan con los encontrados en el análisis realizado con las distancias genéticas. *G. rhizophorae* (A), cuyos individuos se encuentran distribuidos en las provincias Habaneras y el haplotipo *G. rhizophorae* (B) de río Yara, Granma que es idéntico al portado por los peces denominados como *Gambusia* sp. *G. rhizophorae* (A) mostró cinco sitios propios de este grupo y *G. rhizophorae* (B) + *Gambusia* sp un total de 11. *G. punctata* fue la única especie del género cuyos individuos muestran unidad (Tabla 6).

Al analizar *G. punctata*, *G. rhizophorae* (A) y *G. rhizophorae* (B) + *Gambusia* sp sin la gran variación aportada por *G. puncticulata*, debido probablemente al efecto de mutaciones

recurrentes o de polimorfismo ancestral compartido, se observaron 9, 8 y 14 sitios únicos, respectivamente.

### **3.2.2 Género *Rivulus***

El género *Rivulus* mostró solo 23 sitios variables y ninguno de ellos permitió diferenciar a las dos especies en estudio de este género. Cuando se efectuó el análisis de agregación poblacional *R. cylindraceus* quedó fragmentado en dos subgrupos, que igualmente mostraron coincidencia con las entidades evidenciadas en el análisis de las distancias genéticas. *R. cylindraceus* (A), que está constituido por los individuos, pertenecientes a localidades de Pinar de Río y La Habana, y *R. cylindraceus* (B), que está representado por animales, correspondientes a la Ciénaga de Zapata (Matanzas). *R. cylindraceus* (A) presentó nueve sitios que lo diferencian del resto y *R. cylindraceus* (B), solo tres. Sin embargo, *R. insulaepinorum* no presentó sitios diagnósticos, y de los 23 en análisis, siete fueron polimórficos para esta especie. Las secuencias nucleotídicas de los individuos identificados como *R. insulaepinorum* comparten nueve sitios con *R. cylindraceus* (B), diferenciando a este grupo de *R. cylindraceus* (A) (Tabla 7).

### **3.2.3 Género *Girardinus***

En el caso de *Girardinus* se observaron 147 sitios variables, de ellos, seis son sitios que permiten diferenciar a *G. creolus* del resto de las especies del género, 25 a *G. denticulatus*, 11 a *G. falcatus*, 10 a *G. metallicus*, ocho a *G. microdactylus* y cinco a *G. uninotatus* (Tabla 8). Todas las especies clasificadas según sus características morfológicas fueron identificadas en el análisis de agregación poblacional, coincidiendo igualmente con lo encontrado con la estimación de las distancias genéticas.



Tabla 6 (continuación).

Especies	Sitios variables																																											
	1 9 3	1 9 6	2 0 2	2 0 5	2 0 8	2 1 1	2 1 7	2 2 9	2 4 4	2 5 7	2 6 8	2 7 1	2 7 4	2 8 0	2 8 3	2 9 5	2 9 8	3 0 4	3 0 7	3 1 2	3 1 6	3 3 4	3 3 7	3 3 9	3 3 5	3 3 4	3 3 6	3 3 7	3 3 8	3 3 9	4 0 6	4 0 9	4 1 2	4 2 7	4 4 0	4 4 2	4 4 8	4 4 4	4 4 8	4 4 0				
<i>Gambusia punctata</i>	A	±	A	G	C	C	±	C	±	C	C	C	T	C	C	T	G	±	A	G	C	±	T	±	±	G	G	C	A	C	A	C	A	T	G	A	T	G	T	C	T	T	C	A
<i>Gambusia rhizophorae</i> (A)	A	T	A	G	C	C	C	T	T	C	T	G	C	C	T	G	G	A	A	C	G	C	C	T	G	±	C	A	C	A	C	A	T	G	A	C	G	T	C	T	T	C	A	
<i>G. rhizophorae</i> (B) + <i>Gambusia</i> sp	A	C	G	G	C	C	A	C	T	T	C	C	T	C	C	T	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	A	C	A	C	A	T	G	A	C	G	T	T	T	C	C	A
<i>Gambusia puncticulata</i> (A)	G	G	A	A	T	C	A	T	T	T	C	A	T	±	T	±	T	G	A	G	C	A	C	T	T	G	G	A	G	C	A	C	A	C	A	T	T	A	C	C	C	T	C	A
<i>Gambusia puncticulata</i> (B)	G	A	A	A	T	T	A	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	G	G	G	C	G	C	C	T	T	G	A	G	A	A	C	A	C	A	T	T	G	C	C	C	T	C	T
<i>Gambusia puncticulata</i> (C)	G	C	A	A	T	C	A	T	T	T	C	A	T	T	T	T	T	G	A	G	T	G	T	C	T	T	G	A	G	C	G	T	G	C	A	T	T	G	C	T	C	T	T	A

Tabla 6 (continuación).

Especies	Sitios variables																																											
	4 8 7	4 9 3	4 9 4	4 9 6	5 0 2	5 0 5	5 0 6	5 0 8	5 1 1	5 2 0	5 2 3	5 2 6	5 2 9	5 3 5	5 4 1	5 4 4	5 5 0	5 5 1	5 5 3	5 5 6	5 5 9	5 5 1	5 5 5	5 5 8	5 5 1	5 5 7	5 5 8	5 5 9	6 0 1	6 1 0	6 1 3	6 1 6	6 1 9	6 2 2	6 2 5	6 3 1	6 3 4	6 3 0	6 4 6	6 4 9				
<i>Gambusia punctata</i>	G +	±	T	G	A	G	G	±	C	A	T	C	A	T	C	T	±	C	T	T	A	G	T	±	±	C	±	G	A	C	±	A	G	G	C	A	±	C	±	C	A			
<i>Gambusia rhizophorae</i> (A)	A	C	T	G	A	G	G	G	C	A	T	C	A	T	C	C	T	C	T	C	A	G	T	T	A	T	T	A	A	C	C	A	G	G	T	G	A	C	T	C	G	*		
<i>G. rhizophorae</i> (B) + <i>Gambusia</i> sp	A	A	T	G	A	G	G	G	C	T	T	C	A	T	T	T	T	C	T	C	G	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	G	A	T	A	A	C	C	C	A			
<i>Gambusia puncticulata</i> (A)	A	C	C	A	A	A	G	A	T	A	C	A	T	T	T	C	T	T	A	C	A	G	C	A	A	C	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	A	C	T	C	A			
<i>Gambusia puncticulata</i> (B)	A	C	T	A	A	A	G	A	T	A	C	A	T	T	T	C	T	T	A	C	A	G	C	C	A	C	T	A	A	T	C	G	A	G	C	G	A	C	T	±	A			
<i>Gambusia puncticulata</i> (C)	A	T	T	A	G	A	T	G	T	A	C	A	T	C	T	C	T	C	A	C	A	C	C	C	A	C	T	A	A	T	C	T	A	A	T	A	A	T	A	A	T	T	C	A

Tabla 7. Resumen del análisis de agregación poblacional de las especies en estudio del género *Rivulus*.

Especies	Sitios variables																						
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	5	6	
	2	8	9	9	0	2	4	6	6	9	3	3	4	5	6	1	1	3	0	3	5	6	2
	8	4	0	3	8	9	7	5	8	2	1	4	3	1	7	1	5	3	2	6	3	2	5
<i>Rivulus cylindraceus</i> (A)	A*	G	G	T	T	T	G*	C	T*	A*	C*	C*	T	±	G*	±	C	T	C*	T	C	C	A*
<i>Rivulus cylindraceus</i> (B)	G\$	A	±	A	T	T	A\$	T*	C\$	T\$	T\$	T\$	C	A	A\$	T	±	C	T\$	C*	T*	T	T\$
<i>Rivulus insulaepinorum</i>	G\$	±	G	±	±	±	A\$	C	C\$	T\$	T\$	T\$	±	A	A\$	T	C	±	T\$	T	C	±	T\$

±: Sitios polimórficos; \*: Sitios que identifican a grupos infraespecíficos; \$: Sitios que identifican al conjunto *Rivulus cylindraceus*(B) - *Rivulus insulaepinorum*.

Tabla 8. Resumen del análisis de agregación poblacional de las especies en estudio del género *Girardinus*.

Especies	Sitios variables																																											
	1	5	3	1	2	2	3	3	4	5	5	6	6	6	7	7	8	8	9	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2					
<i>Girardinus denticulatus</i>	±	C	T	T	G	T	A	G	C	C	A	G	T	G	G	T	A	G	G	T	G	T	C	G	C	A	A	A	A	T	G	±	G	G	±	C	G	C	G	±	±	C	T	+
<i>Girardinus falcatus</i>	T	C	C	C	A	C	G	±	T	T	A	A	T	G	A	C	G	A	G	T	A	T	T	G	T	A	A	A	A	T	G	C	C	C	T	T	A	C	C	A	C	C	C	
<i>Girardinus uninotatus</i>	T	C	T	T	A	C	G	G	C	T	G	G	C	G	G	C	G	A	A	T	A	T	T	G	C	A	G	A	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	C	A	C	C	C	
<i>Girardinus creolus</i>	C	T	T	T	G	C	G	G	T	T	G	G	C	A	G	T	G	A	G	T	A	T	T	G	C	A	A	G	T	C	G	C	C	G	T	T	A	T	C	A	C	C	C	
<i>Girardinus microdactylus</i>	T	C	T	T	A	C	G	G	T	T	G	G	C	G	G	T	G	A	G	T	A	C	T	A	C	A	A	G	C	T	G	C	C	G	T	T	A	±	±	±	C	T	C	+
<i>Girardinus metallicus</i>	T	C	T	T	A	C	G	G	T	T	G	G	C	G	G	T	G	A	G	C	A	C	C	G	C	G	A	G	T	T	A	C	C	G	T	T	A	T	C	A	C	C	C	

±: Sitios polimórficos; +: Sitios que identifican a un *taxon* nominal



Tabla 8 (continuación).

Especies	Sitios variables																																											
	2 2 0	2 2 3	2 2 9	2 3 2	2 3 5	2 3 8	2 4 1	2 4 4	2 5 6	2 5 9	2 6 2	2 6 5	2 6 8	2 7 1	2 7 4	2 7 7	2 8 0	2 8 6	2 9 2	2 9 5	2 9 8	3 0 1	3 0 1	3 0 2	3 1 0	3 1 6	3 2 5	3 3 0	3 3 6	3 3 9	3 3 2	3 3 3	3 3 5	3 3 8	3 3 1	3 3 4	3 3 7	3 3 0	3 3 6	3 3 0	3 3 2	3 3 3	3 3 8	
<i>Girardinus denticulatus</i>	T	A	T	C	±	A	C	C	G	T	C	±	C	G	C	C	C	T	C	A	±	±	±	C	G	G	A	C	±	C	C	T	A	C	C	T	±	±	A	C	A	A	T	
<i>Girardinus falcatus</i>	T	A	C	T	A	G	T	T	G	C	C	C	C	A	C	T	T	C	T	G	A	A	G	T	G	A	A	T	A	C	T	C	G	C	T	C	A	A	G	T	A	A	C	+
<i>Girardinus uninotatus</i>	T	A	C	T	A	G	T	T	G	C	C	C	C	A	C	T	T	C	T	G	G	A	G	T	G	A	G	T	A	C	T	C	G	C	T	C	A	A	G	T	A	A	T	
<i>Girardinus creolus</i>	C	A	C	T	G	G	T	T	G	C	C	C	C	A	T	C	C	C	T	A	G	G	G	C	A	G	A	T	A	C	T	C	A	C	T	C	A	A	G	T	A	G	T	
<i>Girardinus microdactylus</i>	C	A	C	C	G	A	T	T	A	C	±	C	C	A	T	C	±	C	T	G	G	±	A	C	G	A	A	±	A	T	C	C	±	T	C	C	A	A	±	T	±	G	T	
<i>Girardinus metallicus</i>	C	G	T	C	G	±	T	T	G	C	C	C	T	A	T	C	T	T	T	A	C	A	A	C	G	A	A	T	A	C	T	C	A	T	C	C	A	A	±	T	A	G	T	

Tabla 8 (continuación).

Especies	Sitios variables																																												
	3 9 7	4 0 0	4 0 3	4 0 9	4 1 0	4 1 5	4 1 8	4 2 2	4 2 7	4 3 6	4 4 5	4 4 8	4 4 1	4 4 4	4 4 7	4 4 9	4 4 2	4 4 5	4 4 0	4 4 1	4 4 7	4 4 0	4 4 3	4 4 4	4 4 6	5 0 5	5 0 8	5 1 1	5 1 1	5 1 1	5 1 1	5 2 2	5 2 3	5 3 3	5 3 4	5 4 5	5 5 5	5 5 5	5 5 5	5 5 5	5 5 5	5 6 6	5 6 7		
<i>Girardinus denticulatus</i>	C	C	±	T	G	C	A	C	±	C	±	C	C	±	C	C	A	A	A	G	A	A	T	T	G	±	G	C	C	A	C	G	C	G	T	C	±	C	C	A	±	C	G		
<i>Girardinus falcatus</i>	T	C	A	T	A	T	A	C	A	T	C	T	T	T	C	C	A	A	T	A	G	G	T	T	G	A	T	C	C	A	T	G	C	A	C	T	C	C	T	G	C	T	A	+	
<i>Girardinus uninotatus</i>	C	T	A	T	A	T	A	C	G	T	C	C	C	T	C	C	A	A	A	A	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	T	G	T	A	C	T	C	C	T	A	C	T	G		
<i>Girardinus creolus</i>	C	C	A	C	A	T	A	C	G	C	T	T	C	T	C	C	A	A	A	A	A	A	T	T	G	A	T	C	C	A	C	G	C	A	C	C	C	C	C	C	A	C	T	G	
<i>Girardinus microdactylus</i>	C	T	G	T	A	T	A	T	G	C	T	±	C	T	C	T	A	C	A	A	±	A	C	C	A	A	T	C	T	A	C	A	C	A	C	A	C	T	C	A	C	A	C	C	G
<i>Girardinus metallicus</i>	C	T	A	T	A	T	G	T	G	C	C	T	C	T	T	C	G	A	A	A	A	G	C	C	A	A	T	T	T	A	C	A	C	G	T	T	C	A	C	A	C	C	G		

Tabla 8 (continuación).

Especies	Sitios variables																	
	574	575	577	583	589	592	598	601	603	606	609	612	615	618	621	623	624	626
<i>Girardinus denticulatus</i>	C	C	G	C	C	A	C	T	C	±	±	A	±	±	±	C	±	T
<i>Girardinus falcatus</i>	T	T	A	C	C	A	C	A	T	C	G	G	C	A	C	C	A	T
<i>Girardinus uninotatus</i>	T	T	A	C	C	A	C	A	T	C	G	G	C	A	T	C	A	T
<i>Girardinus creolus</i>	T	T	G	T	C	G	C	C	T	C	A	A	C	A	T	C	A	T
<i>Girardinus microdactylus</i>	T	T	A	C	±	A	C	±	C	C	G	±	C	A	T	C	±	C
<i>Girardinus metallicus</i>	T	T	A	C	C	±	T	T	C	C	G	A	C	A	T	±	A	T

#### 4. Discusión

En el presente trabajo se reafirmó la eficacia del código de barras de ADN para la identificación de especies de peces de agua dulce. En la mayoría de los casos (96%) se observó coincidencia entre la clasificación taxonómica actual y esta metodología molecular, tomando como punto de análisis principal el criterio de un 3% de divergencia evolutiva para distinguir especies hermanas (Hebert *et al.*, 2003a). Igualmente coincidió con lo planteado por varios autores al considerar de que cada una de estas especies debe constituir un clado monofilético (Wiemers y Fiedler, 2007; Meyer y Paulay, 2005).

La tasa de mutación en la mayoría de los genes puede variar de un *taxon* a otro (Ayala 1997; Johns y Avise, 1998). Este fenómeno puede influir en el hecho de que exista solapamiento entre las distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas, lo que dificulta el empleo del código de barras de ADN para la identificación de especies (Stockle, 2003; DeSalle *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio se comprobó que en la mayoría de los géneros, exceptuando *Rivulus*, la distancia entre individuos coespecíficos es mucho menor que entre especies congénicas, si se considera para este análisis solamente las especies hermanas. El promedio de las distancias intraespecíficas e interespecíficas fue de 0.96% y 10.8% respectivamente, valores ligeramente superiores a los encontrados en peces dulceacuícolas de Canadá por Hubert *et al.* (2008), que fueron del 0.3% de divergencia entre individuos de la misma especie y 8.3% entre especies del mismo género. Esta diferencia se debió, fundamentalmente, a nivel intraespecífico, al aporte de *G. puncticulata* (3.3%) e interespecíficamente al elevado valor de divergencia que presentaron los miembros del género *Cubanichtys*, *C. cubensis* y *C. pengelleyi* (18.13%  $\pm$  1.88). Esto último superior a lo encontrado en todos los casos para los géneros presentes en Cuba y entre especies dulceacuícolas de Grecia (14.9%) (Triantafyllidis *et al.*, 2007) e igualmente para la media estimada para peces marinos (9.9%) (Ward *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque coincide con el máximo valor encontrado por Hubert *et al.* (2008) entre especies de peces de agua dulce (19.33%), se impone realizar una revisión taxonómica del género, en particular la asignación de *C. pengelleyi* a este.

#### 4.1. Género *Lucifuga*

*Lucifuga* fue uno de los géneros en que la clasificación taxonómica de las especies basada en los caracteres morfológicos coincidió con la identificada según el código de barras de ADN. No obstante es importante destacar los elevados valores de divergencia genética que presenta *Lucifuga* n.sp respecto a *L. dentata* y *L. subterranea*, 11.1 y 10.8, respectivamente (Tabla 2). Esto apoya la designación de este individuo como perteneciente a una nueva especie para el género, a pesar de que se encuentra en sintopía con *L. dentata* en la caverna Pozo azul, en el Municipio Sandino.

#### 4.2. Género *Girardinus*

El género *Girardinus* es uno de los que más ha llamado la atención de los taxónomos y sobre el cual han existido los mayores desacuerdos con respecto a la clasificación (Eigenmann 1903; Rivas 1958; Rosen y Bailey 1963). Constituye por otra parte, uno de los grupos más biodiversos dentro de los poecilidos cubanos y de la ictiofauna de la isla en general. En el presente análisis se lograron identificar las especies trabajadas, tanto con el uso de las distancias, como directamente de los caracteres nucleotídicos. Los valores de distancias de forma general, oscilaron entre 4.2 y 14.6% (Tabla 3). Estos corresponden con los observados para otros grupos en comparaciones intragenéricas en peces dulceacuícolas (Hubert *et al.* 2008). De forma similar ocurre en las distancias estimadas con el gen *cytb* (John y Avise, 1998). Estos argumentos nos llevan a apoyar la propuesta de Rosen y Bailey (1963) quienes consideraron que las diferencias morfológicas entre las diferentes especies actualmente agrupadas en el género *Girardinus* no justifican la existencia de los géneros *Dactylophallus*, *Toxus*, y *Glaridichthys*.

#### 4.3. Género *Rivulus*

Como se mencionó anteriormente uno de los requisitos fundamentales para el establecimiento del código de barras de ADN es que el promedio de la distancia intraespecífica no exceda el promedio de la distancia interespecífica. En nuestro estudio, uno de los casos en que esta relación no se cumplió fue en el género *Rivulus*. La divergencia promedio estimada entre los individuos de *R. cylindraceus* fue de 1.9%, mientras que la encontrada entre esta y la otra especie reconocida, según la clasificación actual, *R. insulaepinorum*, fue 1.7%; siendo este un valor común en comparaciones entre individuos coespecíficos (Bucklin *et al.*, 2007). Meyer y Paulay (2005) trabajando con

grupos de moluscos bien estudiados y con una clasificación taxonómica bien establecida estimaron un valor umbral, entre la divergencia intra e interespecífica, entre algunas especies de 1.2%. Esto les permitió concluir que establecer un criterio de corte en el nivel de divergencia puede subestimar o sobreestimar el número real de entidades taxonómicas bajo escrutinio. Sin embargo, este no es necesariamente el caso de *Rivulus*, en el que los criterios utilizados para erigir *R. insulaepinorum* como especie se sustentan en un número de caracteres morfológicos muy restringido y a partir de individuos de un solo sexo (de la Cruz y Dubitsky 1976).

En nuestro estudio se observaron divergencias menores del 3% para otras especies. Este es el caso de *Atractosteus tristoechus*, que al ser comparado con la secuencia disponible de *A. spatula* mostró un nivel de divergencia de 1.6%. Sin embargo, esto parece ser una característica de la familia Lepisosteidae pues la divergencia entre otras especies congénéricas *L. oculatus* y *L. osseus* es de solo 0.9%, y entre estos dos géneros de 12.6%. Sin embargo, entre *Rivulus* y *Kryptolebias*, miembros de la misma familia el nivel de divergencia asciende a 29.8%. No obstante a estos casos, el valor umbral del 3% es aplicable a la mayoría de las especies según Hebert *et al.* (2003a). Además como hemos mencionado anteriormente John y Avise (1998), en su análisis, concluyen que para el 98% de las especies hermanas la divergencia genética en el ADNmt (*cytb*), utilizando la distancia K2P, es superior al 2%. Aunque para los peces en general, estos autores encuentran gran dispersión en los estimados de divergencia entre especies, se puede notar que en el caso del género *Rivulus* el límite inferior se encontró alrededor de 3%.

La poca divergencia existente a nivel intragenérico en los *Rivulus* cubanos se puede observar gráficamente en el árbol NJ (Figura 2), donde ninguna de las dos especies constituye un clado monofilético recíproco. Al analizar *R. cylindraceus sensu stricto*, se observaron dos grupos, el (A) que contiene a los individuos de La Habana y Pinar del Río, mientras que el grupo (B) congrega a los ejemplares procedentes de la Ciénaga de Zapata. La divergencia entre estos dos grupos fue de 2.9% valor superior al encontrado entre las dos especies (1.7%), encontrándose en el límite del supuesto para la divergencia intraespecífica (3%). Sin embargo, *R. insulaepinorum* presenta un ejemplar portador de un haplotipo muy similar al detectado en *R. cylindraceus* (B), es por ello que la divergencia entre estos es de solo 1.3%.

El análisis de agregación poblacional (PAA) aportó a la visión de homogeneidad entre ambas entidades, debido a que no existe ningún sitio diagnóstico para identificar a cada una de las especies. Solo se reafirmaron los grupos que se habían hallado con el análisis de distancia, lo cual aporta nuevos elementos acerca de la posible invalidez taxonómica de *R. insulaepinorum*.

En casos como este en que las secuencias nucleotídicas son compartidas entre dos especies, al menos tres posibles causas pueden explicar el patrón observado (Funk y Omland, 2003; Meyer y Paulay, 2005). Primero que el tiempo transcurrido para alcanzar la monofilia recíproca entre las dos especies hermanas es insuficiente para que se hayan fijado estados de los caracteres que distingan una de otra, y aun compartan polimorfismos ancestrales (Kingman, 1982; Tajima, 1983). Segundo, que haya ocurrido u ocurra hibridación introgresiva. Sin embargo, en este caso se deberían detectar clados divergentes con algunos linajes parafiléticos de una u otra especie o de ambas. No obstante, esta posibilidad no es descartable ya que al describir *R. insulaepinorum* de la Cruz y Dubitsky (1976) informan la presencia *R. cylindraceus* en simpatria con la nueva especie. Igualmente, no se puede descartar la posibilidad de que el muestreo realizado haya sido insuficiente. Una tercera causa es la ausencia de verdaderas diferencias que justifiquen el estatus taxonómico de la especie de Isla de la Juventud. En este sentido, resultados recientes (no publicados) considerando un mayor número de ejemplares, orígenes geográficos, así como otros caracteres morfológicos y bioquímicos, indicaron en todos los casos un gran solapamiento.

#### 4.4. Género *Gambusia*

*G. punctata* fue una de las tres especies estudiadas en el género *Gambusia*, siendo esta, dentro del género, la que presentó menor divergencia entre sus individuos (1%). Esta especie mostró con respecto a su especie hermana *G. rhizophorae* un nivel de divergencia de 5.0% (Tabla 4), superior al valor umbral del 3%. Se pudo observar además como todos sus individuos constituyen un clado monofilético (Figura 2). Estos resultados fueron a su vez congruentes con el PAA que identificó cuatro sitios diagnósticos con respecto al resto de las especies analizadas del género. En este sentido, se identificaron dos grupos que corresponden a áreas geográficas disjuntas, una occidental (A), que incluye a diferentes localidades del norte de La Habana, abarcando el rango de distribución conocido para la especie (Robin y Ray, 1986) y otro (B) formado por un individuo de Granma, localidad

inédita para la especie, cuya morfología sugería su clasificación como *G. rhizophorae*. Este grupo además incluye a los ejemplares de Cayo Coco identificados como *Gambusia* sp. Si se analizan estos dos grupos de manera independiente se obtuvo que la menor divergencia se halló entre *G. punctata* y *G. rhizophorae* (A) (4.8%), valor igualmente considerado como apropiado entre especies congénicas, sin embargo se encontró un valor muy superior a este entre *G. rhizophorae* (A) y (B) + *Gambusia* sp (6.1%) (Tabla 5) El PAA coincidió con los dos grupos encontrados en el análisis de distancia (Tabla 6). Este último grupo sugiere la existencia de un nuevo *taxon* probablemente circunscrito a la región oriental. Sin embargo, es necesario un estudio más amplio de los caracteres morfológicos, reproductivos, ecológicos y moleculares para probar la hipótesis de existencia de más de una entidad taxonómica en este caso. Es importante señalar el linaje (B) + *Gambusia* sp muestra una eurihalinidad mucho más marcada que *G. rhizophorae*, ya que se encuentra tanto en zonas con alta salinidad (Cayo Coco), como en aguas dulces (Río Yara, Granma). Características semejantes a las encontradas en *G. rhizophorae* se observaron en *G. puncticulata*, que además presenta una elevada divergencia intraespecífica (3.3%), encontrándose en el límite reportado por Hebert *et al.* (2003a) (3%), y muy similar a la divergencia interespecífica estimada en este estudio para *N. tetracanthus* y *N. ramsdeni* (3.6%). Esta gran variación entre los individuos de *G. puncticulata* se pudo observar en el árbol NJ (Figura 2) donde la especie está definida como un clado monofilético, compuesto por tres subclados. Uno constituido por individuos con un amplio rango de distribución, incluyendo las provincias de Ciudad de La Habana, La Habana, Isla de la Juventud, Matanzas y Guantánamo el cual se denominó *G. puncticulata* (A), otro *G. puncticulata* (B) que contiene individuos de Guanahacabibes (Pinar del Río) y Río Baracoa (La Habana) y el tercero *G. puncticulata* (C) que agrupa a ejemplares que habitan en Cayo Coco. Cuando se estimó la divergencia entre estos grupos se encontró el mínimo valor entre *G. puncticulata* (A) y *G. puncticulata* (B) (4.8%), el cual igualmente es superior a lo reportado para individuos coespecíficos, e igual a lo estimado entre *G. punctata* y *G. rhizophorae* (A) que constituyen especies diferentes. Entre *G. puncticulata* (A) y *G. puncticulata* (C) se encontró una divergencia aun mayor (7.3%) valor similar al encontrado entre especies congénicas de tiburones (7.43%) (Ward *et al.*, 2008) y el máximo valor se halló entre *G. puncticulata* (B) y *G. puncticulata* (C) (8.1%), el cual coincide con el encontrado entre especies de



mariposas del género *Acrolepiopsis* Landry (2007). Equivalente a lo ocurrido en *G. rhizophorae*, en el PAA coincidieron los grupos con los establecidos con las distancias genéticas. En este mismo sentido Waugh *et al.* (2007) en un estudio con 11 especies de *Moa* también encontraron que ambas metodologías, el análisis de caracteres nucleotídicos y de distancias genéticas fueron útiles para la identificación de especies.

Todos los elementos mencionados sugieren que lo actualmente reconocido como *G. puncticulata* sea un complejo formado por más de una especie críptica. Si analizamos la taxonomía de esta especie podemos constatar que han sido identificadas al menos cuatro especies (*G. baracoana* Rivas, 1944; *G. bucheri* Rivas, 1944; *G. monticola* Rivas, 1944; *G. hoewlli* Rivas, 1971), de lo que inicialmente se consideraba una sola entidad. Todas estas especies se han descrito fundamentalmente para la región sur de la isla, por lo que los datos aportados en el presente estudio brindan nuevos elementos para considerar aun nuevas entidades taxonómicas con distribuciones más o menos restringidas. Se debe señalar que los subclados B y C agrupan entidades que habitan en aguas salobres (Río Baracoa y Guanahacabibes) y altamente salinas (Cayo Coco), respectivamente.

Resultados similares a los anteriores fueron descritos por Witt *et al.* (2006), en un grupo de anfípodos del género *Hyaella* donde la mayoría de los grupos formados divergen entre sí en más de un 4%, por lo que sugieren que pudieran ser considerados como especies diferentes. Yassin *et al.* (2007) también encontraron dos especies crípticas en *Zaprionus* usando la metodología del código de barras de ADN. Finalmente, en el caso de *G. puncticulata*, al igual que se sugirió para *G. rhizophorae*, para llegar a conclusiones es necesario hacer un estudio más amplio de los caracteres morfológicos, reproductivos, ecológicos y moleculares para probar la hipótesis de existencia de más de una entidad taxonómica.

La identificación de posibles nuevos linajes de peces dulceacuícolas constituye una evidencia de la complejidad de los procesos paleogeográficos ocurridos desde la formación del archipiélago y del establecimiento de los diferentes *taxa*. El aislamiento observado sugiere la efectividad de barreras naturales para algunas de estas especies ya que en otras la homogeneidad indica dispersión y aislamiento relativamente reciente entre regiones.

En resumen, la mayoría de las especies de peces dulceacuícolas de Cuba que han sido estudiadas han podido ser identificadas como tal empleando la metodología del código de barras de ADN, reafirmando con ello lo planteado por varios autores (Hebert *et al.*, 2003a; Kumar *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007 ) de que efectivamente es una herramienta poderosa para la identificación de especies, tanto con el método de distancias genéticas empleado en la mayoría de los trabajos, como con el de análisis de caracteres diagnósticos referido fundamentalmente por DeSalle *et al.*(2005), teniendo en cuenta que no es trascendental la cantidad de caracteres sino la existencia de mutaciones fijadas en sitios específicos que permiten identificar con ello a un grupo taxonómico determinado. Además este estudio permite consolidar la idea de que aunque el objetivo principal del código de barras de ADN es la asignación de individuos desconocidos a especies conocidas, con frecuencia posibilita el descubrimiento de una diversidad que hasta el momento no se conocía, lo que no significa que esta metodología elimine la taxonomía tradicional, por el contrario, es una herramienta más para la identificación de especies.

## 5. Conclusiones

1. Para la fauna ictioacuícola estudiada, la media de la distancia K2P de individuos coespecíficos fue de 0.96% comparada con un 10.18% para especies congénicas.
2. Se observó congruencia entre la clasificación taxonómica basada en los caracteres morfológicos y la establecida según la metodología del código de barras de ADN, lográndose identificar el 96% de las especies definidas morfológicamente.
3. Las entidades morfológicas reconocidas como *Gambusia puncticulata* muestran variantes moleculares divergentes, por encima del límite de 3%, en poblaciones regionales o locales, que sugieren la existencia de un complejo de especies. Esto aporta nuevas evidencias de subdivisión en este *taxon*.
4. Se identificó un linaje relacionado estrechamente con *Gambusia punctata* y *Gambusia rhizophorae sensu stricto*, que se distribuye probablemente en la región centro-oriental y que parece mostrar una diversidad ecológica más amplia ya que se encuentra tanto en aguas altamente salinas (Cayo Coco) como dulces (Río Yara).
5. Las dos especies cubanas del género *Rivulus* fueron indistinguibles con el marcador utilizado. La divergencia genética inferida entre *R. cylindraceus* y *R. insulaepinorum* fue menor (1.7%) que la observada entre dos linajes geográficos (A) y (B) de *R. cylindraceus* (2.9%). Igualmente, el análisis de agregación no permitió identificar ningún sitio diagnóstico entre las dos especies. Estos resultados cuestionan el estatus taxonómico de especie de *R. insulaepinorum*.
6. La especie *Cubanichthys cubensis* mostró una divergencia genética de más del 18 % con respecto a la especie Jamaicana (*C. pengellegy*). Esto sugiere la necesidad de una revisión taxonómica del género, en particular la asignación de *C. pengellegy* al mismo.
7. Las seis especies estudiadas del género *Girardinus* fueron asignadas sin ambigüedad con respecto a los criterios morfológicos. Los valores de distancias genéticas estimados, se encuentran en el rango inferido a nivel congénico en otras especies dulceacuícolas, lo cual apoya la validez genérica de *Girardinus* para agrupar los antiguos *Dactylophallus*, *Girardinus*, *Glaridichthys* y *Toxus*.

## 6. Recomendaciones

1. Realizar estudios morfológicos, ecológicos y moleculares que permitan comprobar la posible existencia de linajes evolutivos independientes, así como su estatus taxonómico, en especies como *Gambusia puncticulata* y *G. rhizophorae*.
2. Profundizar en el análisis de divergencia evolutiva entre las especies *Rivulus cylindraceus* y *R. insulaepinorum* que permitan evaluar la validez taxonómica de esta última especie. Incluir en el estudio diferentes fuentes de datos taxonómicos y análisis genético-poblacionales que permitan describir los patrones de diversidad observados.
3. Utilizar la información de divergencia molecular intraespecífica encontrada en diferentes grupos, como guía base para identificar especies prioritarias para estudios filogeográficos.

**7. Bibliografía**

1. Alayo, P., 1973. Lista de peces fluviátiles de Cuba. *Torreia*. Nueva serie (29): 53pp.
2. Alayo, P., 1974. Guía elemental de las aguas dulces de Cuba. *Torreia*. Nueva serie (37): 66-68.
3. Anónimo, 2007. How DNA Barcoding Can Help Science. <http://www.sciencedaily.com/>
4. Avise, J.C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, edits. N. Y. London.
5. Avise, J.C.; J. Arnold; M. R. Ball; E. Bermingham; T. Lamb; J.E. Neigel; C.A Reeb and N.C. Saunders, 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
6. Ayala, F.J., 1997. Vagaries of the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7776-7783.
7. Ballard, J.W.O. and M.C. Whitlock, 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* 13: 729-744.
8. Barber P. and S.L. Boyce, 2006. Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopod larvae. *Proc. R. Soc. B*. doi: 10.1098/rspb.2006.3540.
9. Barus, V.; J. Liborsvársky and F. G. Padron, 1981. Notes on *Toxus creolus* (Poeciliidae) from Cuba. *Folia Zoologica*. 30 (4): 363-370.
10. Barus, V. and J. Liborsvársky, 1987. Observations on *Glaridichthys uninotatus* and *G. falcatus* (Poeciliidae) from Cuba. *Folia Zoologica* 37(2): 167-182.
11. Bellwood, D. R.; T.P. Hughes; C. Folke and M. Nystron, 2004. Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429: 827-833.
12. Bensasson D, D-X Zhang; D.L. Hartl and G.M. Hewitt, 2001. Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol Evol* 16: 314-321.
13. Bhadury, P.; M.C. Austen; D.T. Bilton; P.J.D. Lamshead; A.D. Rogers and G.R. Smerdon, 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series* 320: 1-9.
14. Blaxter, M.; J. Mann; T. Chapman; F. Thomas; C. Whitton; R. Floyd and Eyualem-Abebe, 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 360 (1462): 1935-1943.
15. Boore, J. L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27(8): 1767-1780.
16. Boursat, S.J.; H. Nakano; M. Akerman; M.J. Telford; M.C. Thorndyke and M. Obst, 2008. Feeding ecology of *Xenoturbella bocki* (phylum Xenoturbellida) revealed by genetic barcoding. *Molecular Ecology Resources* 8(1): 18-22.

17. Brower, A. V. Z., 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: "ten species" of *Astrartes fugerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiiidae). *Systematics and Biodiversity* 4: 127-132.
18. Bucklin, A.; P.H. Wiebe; S.B. Smolenack; N.J.Copley; J.G. Beaudet; K.G. Bonner; J. Färber-Lorda and J.J. Pierson, 2007. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *Journal of Plankton Research* 29(6): 483-493.
19. Burgess, G. H. y R. Franz 1989. Zoogeography of the Antillean freshwater fish fauna. En *Biogeography of the West Indies: past, present and future*, Charles A. Woods (ed.), Sand hill Crane Press, Gainesville, Florida, pp: 263-304.
20. Bussing, W. A., 2002. Peces de las aguas continentales de Costa Rica. Segunda edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 504 pp.
21. Chang, Y.S.; F.L. Huang and T.B. Lo, 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 38 (2): 138-155.
22. Damas, T., 1999. Biología de los peces vivíparos. *Mar y Pesca* 321: 57-58.
23. Davis, J. I. y K. C. Nixon, 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Bio.* 41 (4): 421-435.
24. de la Cruz, J. y A. M Dubitsky, 1976. Dos nuevas especies de peces dulceacuícolas del género *Rivulus*, Poey (Cyprinodontidae) de Cuba e Isla de Pinos. *Poeyana* (Ser. A) 1-6.
25. DeSalle, R., M. G Egan and M. Siddall, 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360 (1462): 1905 -1916.
26. DeSalle, R., 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology* 20 (5): 1545-1547.
27. Ebach, M. C. and C. Holdrege, 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434 697 doi: 10.1038/434697b.
28. Echelle, A. A.; L. Fuselier; R. A. Van Den Bussche; C. M. L. Rodríguez and M. L. Smith, 2005. Molecular systematics of Hispaniolan pupfishes (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*): Implications for the biogeography of insular Caribbean fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (2006): 855-864.
29. Eigenmann, C. H., 1903. The fresh-water fishes of western Cuba. *Bulletin of the U. S. Fish Commission* 22: 211-236.
30. Elvira, B. and A. Almodóvar, 2001. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. *Journal of Fish Biology*, 59: 323-331.
31. Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
32. Franz, R. and G. H. Burgess, 1983. A new Poeciliid killifish, *Limia rivasi*, from Haiti. *Northeast Gulf Science* 6 (1): 51-54.

33. Funk, D. J and K. E Omland, 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondria DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 397-423.
34. García, I. y L. Koldenkova, 1990. Clave pictórica para las principales especies de peces larvívoros de Cuba. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba 1-55.
35. García-Debrás, A.; A. Pérez y J. Yanger, 1999. Distribución geográfica de los peces ciegos (Ophidiiformes, Bythitidae). *Troglobio*, 4: 2-3.
36. Graur, D. and W. H. Li, 2000. In *Fundamentals of Molecular Evolution*, pp. 1-481. USA: Sinauer Associates.
37. Hajibabaei, M.; G. A. C. Singer and D. A Hickey, 2006. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome* 49(7): 851-854.
38. Hajibabaei, M.; D. H. Janzen; J.M. Burns; W. Hallwachs and P. D. N. Hebert, 2006b. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS* 103(4): 968-971.
39. Hall, T. A., 1999. BioEdit: A user- friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
40. Hebert, P.D.N; A. Cywinska; S.L. Ball and J.R. deWaard, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-322.
41. Hebert, P. D. N.; S. Ratnasingham, and J. R. deWaard, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B.* 270: S96-S99.
42. Hebert, P. D. N.; E. H Penton; J. M Burns; D. H. Janzen and W Hallwachs, 2004a. Ten Species in One: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(41): 14812-14817.
43. Hebert, P. D. N.; Stoeckle M. Y.; Zemplak T. S. and Francis C. M., 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2(10): 1657- 1663.
44. Hill, J. E., 2002. Exotic fishes in Florida. Florida fishes. *Lakeline*. 39-41.
45. Hubert, N, R. Hanner, E. Holm, N. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, A. Curry, P. Bentzen P, Zhang, J. April and L. Bernatchez, 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PloS ONE* (en prensa).
46. John, G. C. and J. C. Avise, 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochromo b gene. *Mol. Biol. Evol.* 15(11): 1481-1490.
47. Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative statistics of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
48. Kingman, J.F.C., 1982. The coalescent. *Stochastic Process and their Applications* 13: 245-248.
49. Koldenkova, L. y I. García, 1987. Nota sobre la resistencia a la desecación de los huevos de *Rivulus cylindraceus* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Miscelánea Zoológica* 29: 4-5.

50. Kressk, W. J. and D. L. Erickson, 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS* 105 (8): 2761–2762.
51. Kumar, S.; K. Tamura and M. Nei, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
52. Kumar Pradeep, N.; A.R. Rajavel; R. Natarajan and P. Jambulingam, 2007. DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 44(1): 1-7.
53. Lambert, D. M.; A. Baker; L Huynen; O. Haddrath; P. D. N. Hebert and C. D. Millar, 2005. Is a Large-Scale DNA-Based Inventory of Ancient Life Possible? *Journal of Heredity* 96(3): 279-284.
54. Landry, J.F., 2007. Taxonomic review of the leek moth genus *Acrolepiopsis* (Lepidoptera: Acrolepiidae) in North America. *The Canadian Entomologist* 139(3): 319-353.
55. La Roche, J.; M. Snyder; D. I. Cook; K. Fuller and E. Zouros, 1990. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea Scallop *Placopecten magellanicus*. *Mol. Biol Evol.* 7(1): 45-64.
56. Lee, D.S.; S.P. Platania and G.H. Burgess, 1983. Atlas of North American freshwater fishes, supplement. Occasional Papers of the North Carolina Biological Survey no. 1983-6. North Carolina State Museum of Natural History, Raleigh, N.C. 67 pp.
57. Lemera S.; D. Aurelle; L. Vigliola; J.D. Durand and P. Borsa, 2007. Cytochrome b barcoding, molecular systematics and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). *Comptes Rendus Biologies* 330(1): 86-94.
58. Lucinda, P.H.F., 2003. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brazil. p. 555-581.
59. Menéndez, Z.; E. Manso; M. Castex; O. Fuentes; N. Hernández; I. García, 2007. Algunos aspectos ecológicos de la ictiofauna larvífaga presente en Cayo Santa María, Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 59(3): 73-76.
60. Meyer, C. P. and G. Paulay, 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biol* 3(12): e422.
61. Moritz, C. and C. Cicero, 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biol* 2(10): e354.
62. Moura, C. J.; D. J. Harris; M. R Cunha; and A. D. Rogers, 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta* 37(1): 93-108.
63. Mullis, K. and F. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA *invitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
64. Myers, S., 1938: Fresh-water fishes and West Indian Zoogeography. En: Annual Report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution, 92 (1938 for the year 1937): 339-364.



65. Nelson, L.A.; J.F. Wallman and M. Dowton, 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 21(1): 44-52.
66. Newmaster, S.G.; A.J. Fazekas; R.A.D. Steeves and J. Janovec, 2007. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Notes*. OnlineEarly.
67. Nielsen, J.G.; D.M. Cohen; D.F. Markle and C.R. Robins, 1999. FAO Species Catalogue. Ophidiiform Fishes of the World (Order Ophidiiformes). Vol 18, 178pp.
68. Okimoto, R.; J. L. MacFarlane; D. O. Clary and D. R. Wolstenholme, 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130: 471-498.
69. Page, L.M. and B.M. Burr. 1991. A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico. Houghton Mifflin Company, Boston. 432 pp.
70. Poey, F., 1854. Los guajacones, pececillos de agua dulce. *Memorias de la Historia Natural de la Isla de Cuba* 1 (32): 374-390.
71. Rauchenberger, M., 1989. Systematics and Biogeography of the genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Novitataes*. 74pp.
72. Rivas, L. R., 1944. Contributions to the study of the Poeciliid fishes of Cuba. I. Descriptions of six new species of the subfamily Gambusiinae. *Proceedings of the New England Zoölogical* 23: 41-53.
73. Rivas, L. R., 1958. The origin, evolution, dispersal and geographical distribution of the Cuban poeciliid fishes of the tribe Girardinini. *The American Philisophical Society* 102 (3): 281-320.
74. Rivas, L. R. and G. S. Myers, 1950. A new genus of Poeciliid Fishes from Hispaniola, with Notes on genera allied to *Poecilia* and *Mollienesia*. *Copeia* 4: 288-294.
75. Rivero, L. H., 1951. Peces larvívoros. *Boletín de historia natural de la Sociedad Zoológica Felipe Poey* 2 (6): 90-97.
76. Rivero, L. H. and L. R. Rivas, 1944. Studies of Cyprinodont fishes. Two new genera of the tribe Girardinini, from Cuba. *Torreia* 12: 3-19.
77. Robins, C.R. and G.C. Ray, 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston, U.S.A. 354 pp.
78. Rodríguez, C. M., 1997. Phylogenetic analysis of the Tribe Poeciliini (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Copeia* 4:663-679.
79. Rodríguez, J.; E. González; N. Hernández; V. Capó y I. García, 2004. Comparación morfológica e histológica del tubo digestivo de *Gambusia puncticulata* y *Girardinus metallicus*, peces utilizados en el control biológico de mosquitos. *Rev. Cubana Med. Trop.* 56(1): 73-76.
80. Rodríguez, R., 2007. Ecología de los peces del arroyo Govea, Bejucal Provincia Habana. Tesis de diploma. 54 pp.

81. Rosen, D.E. and R. M. Bailey, 1963. The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography and systematics. *Bulletin of the American museum of Natural History* 26 (1): 176pp.
82. Saitou, N. and M. Nei, 1987. The Neighbor-Joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
83. Schindel D. E., 2005. DNA Barcoding and the Consortium for the Barcode of Life. <http://www.barcoding.si.edu/>
84. Smith, M.A.; N.E. Woodley; D.H. Janzen; W. Hallwachs and P.D. Hebert, 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (10): 3657-62.
85. Smith M. A., N. A. Poyarkov and P.D. N. Hebert, 2007. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Notes*. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01964.x
86. Stahls, G. and E. Savolainen, 2008. mtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 46(1) 82-87
87. Stoeckle M., 2003. Taxonomy, DNA and the bar code of life. *BioScience* 53: 2-3.
88. Stoeckle M.; P. E. Waggoner and J. H. Ausubel, 2005. Barcoding life, illustrated. <http://barcoding.si.edu/>.
89. Summerbell, R.C.; M.K. Moore; M. Starink-Willemse and A. Van Iperen, 2007. ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum*. *Medical Mycology* 45(3) 193-200.
90. Suttkus, R.D., 1963. Fishes of the western North Atlantic. *Mem. Sears. Found. Mar. Res.* 1 (3): 61-88.
91. Tajima, F., 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460
92. Triantafyllidis, A.; D.C. Bobori and C. Koliimitra, 2007. DNA barcoding in Greek freshwater fish: the cases of Doirani and Volvi lakes. *ESEB XI Congress Uppsala Sweden*. <http://www.dnabarcoding.ca/>
93. Vales, M.; A. Álvarez; L. Montes y A. Ávila, 1998: Pisces. En: Estudio nacional sobre la diversidad biológica en la República de Cuba. CESYTA, Madrid. 202-203.
94. Vences, M.; M. Thomas; A. Van der Meijden; Y. Chiari and D. R. Vieites, 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibian. *Front. Zool.* 2: 1-12.
95. Vergara, R. R., 1980. Principales características de la ictiofauna dulceacuícola cubana. *Revista Ciencias Biológicas* 5: 95-106.
96. Vergara, R. R., 1992. Pincipales características de la ictiofauna dulceacuícola cubana. *Academia* 27pp.

97. Ward R. D.; T. S Zemplak.; B. H. Innes; P. R. Last and P. D. N. Hebert, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Proc. R. Soc. B.* doi: doi:10.1098/rstb.2005.1716
98. Ward, R. D.; B. H. Holmes; T. W William and P. R Last, 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59(1): 57-71.
99. Waugh, J; L. Huynen; C. Millar and D. Lambert, 2007. DNA barcoding of animal species – response to DeSalle. *BioEssays* 30: 92-93.
100. Wiemers, M. and K. Fiedler, 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). <http://www.frontiersinzoology.com/content/4/1/8>
101. Witt, J. D.S.; D. L Threlhoff and P. D.N Hebert, 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology* 15(10): 3073 – 3082.
102. Wolstenholme, D: R., 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and Evolution. *Inv. Rev. Cytology* 141: 173-214.
103. Yassin, A.; P. Capy; L. Madi-Ravazzi; D. Ogereau and J. R. David, 2007. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. *Molecular Ecology Notes*. <http://www.dnabarcoding.ca/>

# **ANEXOS**

Anexo 1. Clasificación taxonómica de las especies en estudio.

- Reino:** Animalia  
**Phylum:** Chordata  
**Subphylum:** Vertebrata  
**Clase:** Osteichthyes  
**Subclase:** Actinopterygii  
**Superorden:** Teleostei  
**Orden:** Cyprinodontiformes  
**Suborden:** Aplocheiloidei  
**Familia:** Poeciliidae  
**Subfamilia:** Poeciliinae  
**Tribu:** Gambusini  
**Género:** *Gambusia*  
**Especies:** *Gambusia puncticulata* (Poey, 1854)  
*Gambusia punctata* (Poey, 1854)  
*Gambusia rhizophorae* (Rivas, 1969)
- Tribu:** Girardinini  
**Género:** *Girardinus*  
**Especies:** *Girardinus creolus* (Garman, 1895)  
*Girardinus denticulatus* (Garman, 1895)  
*Girardinus falcatus* (Eigenmann, 1903)  
*Girardinus metallicus* (Poey, 1854)  
*Girardinus microdactylus* (Rivas, 1944)  
*Girardinus uninotatus* (Poey, 1860)
- Género:** *Quintana*  
**Especie:** *Quintana atrizona* (Hubbs, 1934)
- Tribu:** Poecilini  
**Género:** *Limia*  
**Especie:** *Limia vittata* (Guichenot, 1853)
- Familia:** Rivulidae  
**Subfamilia:** Rivulinae  
**Género:** *Rivulus*  
**Especies:** *Rivulus cylindraceus* (Poey, 1860)  
*Rivulus insulaepinorum* (de la Cruz y Dubitsky, 1976)

Anexo 1 (continuación)

**Suborden:** Cyprinodontoidei  
**Familia:** Cyprinodontidae  
**Género:** *Cubanichtys*  
**Especie:** *Cubanichtys cubensis* (Poey, 1860)  
  
**Género:** *Cyprinodon*  
**Especie:** *Cyprinodon variegatus* (Lacepede, 1803)

**Suborden:** Labroidei  
**Familia:** Cichlidae  
**Subfamilia:** Cichlasomatinae  
**Género:** *Nandopsis*  
**Especie:** *Nandopsis ramsdeni* (Fowler, 1938)  
*Nandopsis tetracanthus* (Valenciennes, 1831)

**Orden:** Ophidiiformes  
**Suborden:** Bythitoidei  
**Familia:** Bythitidae  
**Subfamilia:** Brosmophycinae  
**Género:** *Lucifuga*  
**Especies:** *Lucifuga dentata* (Poey, 1858)  
*Lucifuga subterranea* (Poey, 1858)  
*Lucifuga* n.sp.

**Orden:** Atheriniformes  
**Suborden:** Atheriniformes  
**Familia:** Atherinidae  
**Subfamilia:** Atherininae  
**Género:** *Alepidomus*  
**Especie:** *Alepidomus evermanni* (Eigenmann, 1903)

**Orden:** Lepisosteiformes  
**Familia:** Lepisosteidae  
**Género:** *Atractosteus*  
**Especie:** *Atractosteus tristoechus* (Bloch y Schneider, 1801)

Anexo 2. Sitios de muestreo, número de la muestra empleado en el análisis de ADN y número de catálogo para cada uno de los individuos estudiados.

<b>Especies</b>	<b>No. de muestra</b>	<b>No. de catálogo (MFP18.)</b>	<b>Localidad</b>	<b>Provincia</b>
<i>Gambusia puncticulata</i>	8	000147	Arroyo Govea, Bejucal	La Habana
<i>Gambusia puncticulata</i>	75	000218	Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Gambusia puncticulata</i>	49	000128	Río Quibú	C. Habana
<i>Gambusia puncticulata</i>	42	000109	Piojos, Guanahacabibes	Pinar del Río
<i>Gambusia puncticulata</i>	50	000133	Río Almendares	C. Habana
<i>Gambusia puncticulata</i>	55	000152	Manantial, Baracoa	La Habana
<i>Gambusia puncticulata</i>	59	000124	Alta Habana	C. Habana
<i>Gambusia puncticulata</i>	72	000167	Laguna Facundo, Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Gambusia puncticulata</i>	78	000181	Casimbas a 1500 m de la carretera	Matanzas
<i>Gambusia puncticulata</i>	82	000177	Charcas remanentes. Pálpite	Matanzas
<i>Gambusia puncticulata</i>	88	000216	Río Los Indios	Isla de la J.
<i>Gambusia puncticulata</i>	93	000219	Río Sagua, Salvador	Guantánamo
<i>Gambusia puncticulata</i>	97	000132	Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Gambusia punctata</i>	7	000146	Arroyo Govea, Bejucal	La Habana
<i>Gambusia punctata</i>	22	000116	Soroa	Pinar del Río
<i>Gambusia punctata</i>	31	000098	La Chorrera	La Habana
<i>Gambusia punctata</i>	40	000106	Los Indios	Isla de la J.
<i>Gambusia punctata</i>	41	000100	Sendero la Batata	Sti. Spiritus
<i>Gambusia punctata</i>	61	000122	Parque Lenin	C. Habana
<i>Gambusia punctata</i>	73	000166	Laguna Facundo Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Gambusia punctata</i>	76	000180	Casimbas a 1500 m de la carretera	Matanzas
<i>Gambusia punctata</i>	77	000179	Charcas remanentes. Pálpite	Matanzas
<i>Gambusia punctata</i>	103	000203	Río Los Indios	Isla de la J.
<i>Gambusia rhizophorae</i>	13	000153	Río Guanabo	C. Habana
<i>Gambusia rhizophorae</i>	33	000154	Río Guanabo	C. Habana
<i>Gambusia rhizophorae</i>	43	000110	Río Yara	Granma
<i>Gambusia rhizophorae</i>	52	000119	Puente Baracoa	La Habana
<i>Gambusia rhizophorae</i>	54	000151	Manantial, Baracoa	La Habana
<i>Gambusia rhizophorae</i>	48	000129	Río Quibu	La Habana
<i>Gambusia sp</i>	57	000127	Cenote La Jenifer, Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Gambusia sp</i>	90	000220	Cenote La Jenifer, Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Girardinus creolus</i>	20	000117	Soroa	Pinar del Río
<i>Girardinus creolus</i>	89	000217	Soroa	Pinar del Río
<i>Girardinus denticulatus</i>	16	000136	Río Yara	Granma
<i>Girardinus denticulatus</i>	36	000112	Caburní	Sti. Spiritus
<i>Girardinus denticulatus</i>	65	000130	Río Sagua, Salvador	Guantánamo
<i>Girardinus denticulatus</i>	87	000214	Río Sagua, Salvador	Guantánamo
<i>Girardinus falcatus</i>	11	000139	Colón	Matanzas
<i>Girardinus falcatus</i>	67	000164	Laguna Facundo, Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Girardinus falcatus</i>	85	000173	Charcas remanentes. Pálpite	Matanzas

Anexo 2 (continuación)

<i>Girardinus metallicus</i>	10	000144	Arroyo Govea, Bejucal	La Habana
<i>Girardinus metallicus</i>	38	000099	La Chorrera	La Habana
<i>Girardinus metallicus</i>	68	000165	Laguna Facundo Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Girardinus metallicus</i>	84	000174	Charcas remanentes. Pálpite	Matanzas
<i>Girardinus metallicus</i>	92	000205	Sierra de La Cañada	Isla de la J.
<i>Girardinus metallicus</i>	100	000206	Itabo	Isla de la J.
<i>Girardinus microdactylus</i>	19	000115	Soroa	Pinard el Río
<i>Girardinus microdactylus</i>	46	000107	Sierra de La Cañada	Isla de la J.
<i>Girardinus microdactylus</i>	96	000204	Itabo	Isla de la J.
<i>Girardinus uninotatus</i>	12	000145	Sierra Rosario	Pinar del Río
<i>Girardinus uninotatus</i>	21	000118	Soroa	Pinar del Río
<i>Quintana atrizona</i>	91	000209	Itabo	Isla de la J.
<i>Quintana atrizona</i>	95	000210	Itabo	Isla de la J.
<i>Limia vittata</i>	9	000138	Arroyo Govea, Bejucal	La Habana
<i>Limia vittata</i>	17	000202	Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Limia vittata</i>	45	000113	Piojos, Guanahacabibes	Pinar del Río
<i>Limia vittata</i>	58	000126	Cenote La Jenifer, Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Limia vittata</i>	64	000121	Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Limia vittata</i>	69	000172	Laguna Facundo Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Limia vittata</i>	79	000182	Casimbas a 1500 m de la carretera	Matanzas
<i>Limia vittata</i>	83	000175	Charcas remanentes. Pálpite	Matanzas
<i>Limia vittata</i>	99	000207	Itabo	Isla de la J.
<i>Limia vittata</i>	102	000208	Río Los Indios	Isla de la J.
<i>Rivulus cylindraceus</i>	3	000142	Guanimar	La Habana
<i>Rivulus cylindraceus</i>	2	000105	La Chorrera	La Habana
<i>Rivulus cylindraceus</i>	47	000108	Soroa	Pinar del Río
<i>Rivulus cylindraceus</i>	63	000148	Ciénaga de Zapata	Matanzas
<i>Rivulus cylindraceus</i>	74	000171	Laguna Facundo, Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Rivulus insulaepinorum</i>	4	000143	Sierra de la Cañada	Isla de la J.
<i>Rivulus insulaepinorum</i>	39	000104	Los Indios	Isla de la J.
<i>Rivulus insulaepinorum</i>	44	000111	Sierra de la Cañada	Isla de la J.
<i>Cubanichthys cubensis</i>	5	000140	Cienaga de Zapata	Matanzas
<i>Cubanichthys cubensis</i>	35	000102	Guanimar	La Habana
<i>Cubanichthys cubensis</i>	86	000176	Charcas remanentes. Pálpite	Matanzas
<i>Cubanichthys cubensis</i>	98	000212	Río Los Indios	Isla de la J.
<i>Cubanichthys cubensis</i>	101	000211	Itabo	Isla de la J.
<i>Cyprinodon variegatus</i>	18	000114	Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Cyprinodon variegatus</i>	34	000134	Piojos, Guanahacabibes	Pinar del Río
<i>Nandopsis ramsdeni</i>	15	000149	Río Guaso	Guantánamo
<i>Nandopsis ramsdeni</i>	80	000215	Río Guaso (Cautiverio)	Guantánamo



Anexo 2 (continuación)

<i>Nandopsis tetracanthus</i>	1	000135	Soroa	Pinar del Río
<i>Nandopsis tetracanthus</i>	30	000123	Sierra de La Cañada	Isla de la J.
<i>Nandopsis tetracanthus</i>	56	000125	Cenote La Jenifer, Cayo Coco	Ciego de Ávila
<i>Nandopsis tetracanthus</i>	66	000163	Laguna Facundo Ciénagas de Zapata	Matanzas
<i>Lucifuga dentata</i>	23	000195	Cueva en el Holandés, Guanahacabibes	Pinar del Río
<i>Lucifuga dentata</i>	25	000196	Ashton, Artemisa	La Habana
<i>Lucifuga dentata</i>	26	000197	Perico Sánchez, Jagüey	Matanzas
<i>Lucifuga subterranea</i>	24	000198	Juanelo Piedra, Batabanó	La Habana
<i>Lucifuga subterranea</i>	27	000199	Paredones, Caimito	La Habana
<i>Lucifuga subterranea</i>	28	000200	Ashton, Artemisa	La Habana
<i>Lucifuga n.sp.</i>	29	000201	Pozo Azul, Manuel Lazo	Pinar del Río
<i>Alepidomus evermanni</i>	6	000141	Ciénaga de Zapata	Matanzas
<i>Alepidomus evermanni</i>	32	000101	Guanimar	La Habana
<i>Alepidomus evermanni</i>	71	000170	Laguna Facundo, Ciénaga	Matanzas
<i>Alepidomus evermanni</i>	94	000213	Itabo	Isla de la J.
<i>Atractosteus tristoechus</i>	14	000137	Ciénaga de Zapata	Matanzas

**A mi abuela, una vez más.**