



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Variación genética de las especies del género *Typhlatya*
(Decapoda: Atyidae) en sistemas anquihalinos de la
península de Yucatán, México.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSÉ MANUEL CHÁVEZ DÍAZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS OJEDA ESCOTO**

Ciudad Universitaria, CDMX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Caminantes de un día, nuestros pasos dejan en la arena del camino eternas huellas. Nada ocurre que no haya sido determinado por lo que le ha precedido, y el futuro está hecho de las prolongaciones desconocidas del pasado.

Julio Verne, los naufragos del “Jonathan”

AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento para llevar a cabo este estudio a través de los proyectos CONACYT Ciencia Básica, 155644-546, “Procesos que generan y mantienen la diversidad en un ambiente extremo: los sistemas anquihalinos de Yucatán”, Texas A&M-CONACYT Collaborative Research Grant Program “What promotes species diversification in anquihaline habitats? y DGAPA-PAPIIT UNAM IN205314, ¿Puede la criptofauna de crustáceos indicar el estado de conservación de un arrecife?” otorgados al Dr. Fernando Álvarez.

A mis padres por el inmenso amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por el animo brindado y por los valores que me han fomentado, además de ser mi mejor ejemplo de personas a seguir, los amo. A mis hermanos Karla y Aksel por compartir, cuidarme y acompañarme en este camino, a Conchita por enseñarme tantas cosas importantes de la vida, la grandeza y bondad que puede haber en una persona, te extraño.

A mis profesores Patricia Roche, Gabriel Olalde, Alejandro Marché, Claudia Benítez, Verónica Muñoz, Rosa Ilescas, Francisco Vega, Margarita Hermoso, Sara Frías y Bertha Molina por sus infinitas enseñanzas y su aportación a mi formación académica.

A los miembros de la CNCR que me apoyaron en la realización de esta tesis Dr. Fernando Álvarez, Dr. José Villalobos, M. en C. Gema Armendáriz y M. en C. Eduardo Torres.

A mi tutor el Dr. Juan Carlos Ojeda por el tiempo, apoyo, enseñanzas teóricas y prácticas, por la paciencia y su amistad ¡gracias! por ser pilar fundamental de este trabajo.

A mis amigos Martha, Alejandra Zamora, Isaac, Alinne, Joshua, Víctor, Argenis, Anita, Carolina, Irvin Guerrero, Ernesto Espinoza, Laura (Pirata) y Marlenne, gracias por su inmensa luz, sus consejos. A mis amigos y compañeros de la Colección Nacional de Crustáceos Ia, Olinka, Monse, Dona, Sergio, Raquel, Eric, Janete, Viri, Faby y Adán por su apoyo y su grata compañía en momentos inolvidables.

ÍNDICE

Agradecimientos	2
Resumen	4
Introducción	5
Sistemas anquihalinos.....	5
Rutas de colonización de ambientes anquihalinos	9
Género <i>Typhlatya</i>	10
Estudios genéticos	17
Antecedentes.....	19
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares	22
Área de estudio.....	23
Material y método.....	26
Colecta de los organismos.....	26
Análisis morfológico.....	26
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....	27
Edición y alineamiento de secuencias	28
Análisis filogenético	29
Distancias genéticas	30
Tiempos de Divergencia.....	30
Resultados.....	30
Análisis morfológico.....	30
Análisis molecular	32
Distancias genéticas	34
Discusión	38
Análisis morfológico.....	38
Análisis molecular	42
Conclusiones.....	46
Literatura citada.....	47

RESUMEN

El género *Typhlatya* está formado por alrededor de 17 especies, son decápodos carídeos pertenecientes a la familia Atyidae que se distribuyen en islas Galápagos, península de Yucatán, ciertas islas del Mar Caribe y del Atlántico así como en el Mar Mediterráneo occidental. Debido a su peculiar distribución se les considera organismos relictos del mar de Tetis. En México se han descrito 4 especies: *T. campecheae*, *T. dzilamensis*, *T. mitchelli* y *T. pearsei*, las cuatro habitan la península de Yucatán. Hasta la fecha ningún estudio filogenético del género ha incluido las cuatro especies que habitan en la península de Yucatán. Con la finalidad de aumentar el conocimiento del género, se analizó la variación genética entre las especies mexicanas de *Typhlatya* de sistemas anquihalinos en la península de Yucatán, a través de la secuenciación del gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I. Los individuos secuenciados y analizados provienen de 3 cenotes del Sistema Ox Bel Ha (SOBH), Quintana Roo, así mismo, se revisó material biológico depositados en la Colección Nacional de Crustáceos. Tras las revisión morfológica de los individuos estudiados se encontró que existen dos morfotipos que no han sido descritos taxonómicamente. La topología obtenida de los árboles filogenéticos indica la existencia de seis especies con diferente grado de variación genética para la península de Yucatán, siendo monofilético el grupo mexicano. Por último se realizó el análisis de tiempos de divergencia con el cual se estimó la edad aproximada del ancestro común de las especies mexicanas que fue a principios del Mioceno aproximadamente y se dató el tiempo en el que divergió cada especies mexicana.

INTRODUCCIÓN

La península de Yucatán es la porción expuesta de la plataforma de Yucatán, la cual separa al Golfo de México del Mar Caribe y tiene una extensión de 300,000 km² (Smart *et al.*, 2006; Torres, 2009). La península de Yucatán es una plataforma calcárea cuyo componente mineral principal es el carbonato de calcio, se originó en la era Cenozoica. A lo largo del litoral oriental de Quintana Roo, donde están algunas de las cuevas mayores, las rocas superficiales están compuestas de material arrecifal coralino pleistocénico datados en 120,000 años y que tienen como mínimo un grosor de 12 m (Iliffe, 1993, 2012; Smart *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2008). Otra formación que se encuentra rodeando muchos de los sistemas de cuevas es la Carrillo Puerto que data de las épocas Mioceno – Plioceno con un grosor de 15 m.

La costa este de la península de Yucatán, en el estado de Quintana Roo, se encuentra bordeada por una barrera arrecifal de cerca de 300 km (Álvarez *et al.*, 2000). Los arrecifes son estructuras calcáreas con una cubierta de tejido vivo, que generan inmensa cantidad de espacios y microambientes. La importancia de estos radica en su alta productividad y en la forma en que modifican el relieve de la costa al erigirse en grandes masas calcáreas (Álvarez *et al.*, 2000). Así, a través del tiempo geológico, con las transgresiones y regresiones del nivel del mar debido a los ciclos de Milankovitch, los arrecifes coralinos acaban formando parte de las regiones emergentes de los continentes, lo que una vez fueron arrecifes vivos ahora están en tierra firme (Álvarez *et al.*, 2000; Vázquez-Domínguez y Arita, 2010) y sujetos a la acción de distintos agentes de erosión y sedimentación. Así, por distintos procesos como disolución, se pueden formar sistemas de cuevas sumergidas que son características de pocos lugares en el mundo, como en la península de Yucatán, México, en donde se desarrollan extensos sistemas de cuevas inundadas que se extienden desde la costa hacia el continente hasta 12 km (Smart *et al.*, 2006).

Sistemas anquihalinos

Un sistema anquihalino es definido por Stock *et al.* (1986) como “cuerpos de agua halina usualmente con una exposición restringida al espacio abierto, siempre con

conexiones subterráneas con el mar más o menos extensas, que muestran influencias importantes tanto del medio terrestre como del medio marino” (Álvarez e Iliffe, 2008; Bishop *et al.*, 2015). Una definición más reciente propuesta por Bishop *et al.* (2015) define al sistema anquihalino como “un estuario subterráneo con influencia mareal, localizado dentro de grietas y cuevas en terrenos cársticos y volcánicos que se extienden tierra adentro hasta el límite de la intrusión del agua marina. Además, este estuario subterráneo es caracterizado por una estratificación química y física, fusionándose el sistema marino de la costa y el sistema de agua subterránea continental. En pocas palabras, son hábitats acuáticos subterráneos en los que las columnas de agua marina y dulce son separadas por haloclinas y se caracterizan por un elevado contenido de sulfuro, oscuridad, baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno (Mejía-Ortíz, 2013).

Los sistemas anquihalinos se componen de cenotes, que funcionan como entradas al sistema, su diámetro varía en cada uno de ellos; las cavernas son partes donde aún se alcanza a ver la luz que entra desde los cenotes y los pasajes subterráneos o cuevas, que están desprovistos de luz (Chávez, 2015). “Cenotes” es como se le conoce en México, mientras que en otras regiones se les conocen como dolinas y ovalas (Ordóñez y García, 2010).

La orientación de muchos de estos sistemas de cuevas da lugar a extensos sistemas interconectados de paso, que son paralelos entre sí y perpendiculares a la línea de costa debido a las fracturas y fallas de la región. En el sistema anquihalino, la marea empuja el agua marina hacia el interior; esta desplaza verticalmente al agua dulce superficial que a su vez fluye hacia la costa, bajo la fuerza de gravedad (Solís y Laguarda, 2010). Debido a la densidad del agua en los sistemas anquihalinos se forman dos columnas diferentes; el agua continental con menor cantidad de sales disueltas, más ligera, se ubica por encima del agua marina que es más densa, sin embargo, hay una transición o en ocasiones más de una, con un grosor desde uno hasta varios metros, en donde las dos columnas de agua se juntan, formándose una película con características distintivas llamada haloclina, en ocasiones puede haber más de una haloclina. La profundidad a la que se encuentra esta haloclina dependerá de la distancia con respecto a la costa y de la temporada del año (Álvarez *et al.*, 2000). La concentración salina del agua dulce superficial disminuye con la distancia de la costa, por lo que el agua totalmente dulce se encuentra a una distancia considerable de la

costa (Solís y Laguarda, 2010). La salinidad promedio por debajo de la haloclina es alrededor de 16‰. Los sistemas anquihalinos también se caracterizan por un elevado contenido de sulfuro, oscuridad y una baja disponibilidad de nutrientes (Mejía-Ortíz *et al.*, 2013).

Fauna anquihalina

Las cuevas anquihalinas contienen una elevada diversidad de fauna endémica (Iliffe y Kornicker, 2009; Bishop *et al.*, 2015). La fauna acuática que habita en los sistemas anquihalinos se puede clasificar dependiendo de las adaptaciones al tipo de ambiente como: estigobios, los que son muy especializados y que viven todo su ciclo dentro de cavernas; estigófilos, facultados para vivir en aguas subterráneas pero se encuentran de igual forma en aguas superficiales; y estigoxenos, que aparecen sólo en raras ocasiones en aguas subterráneas (Barr y Holsinger, 1985; Iliffe y Bishop, 2007; Benítez, 2014; Bishop e Iliffe, 2015; Chávez, 2015).

Las fuentes de alimento que sustentan la fauna en sistemas anquihalinos dependen de la importación de desechos de los ambientes vecinos, acuáticos y terrestres (Escobar *et al.*, 2002; Bishop *et al.*, 2015). En los sistemas anquihalinos mexicanos hay cuatro recursos potenciales de materia orgánica: 1) el suelo proveniente del bosque, estos recursos pueden ser transportados por filtración del subsuelo o a través de deposición en cenotes; 2) algas de los cenotes que fungen como productores primarios; 3) bacterias, la materia orgánica está generalmente disuelta y es procesada por bacterias, algunos compuestos como metano o sulfuro de hidrógeno son procesados por microorganismos quimiótrofos; 4) materia proveniente del mar, que es arrastrada por corrientes. Algunos animales detritívoros fungen como productores primarios y proveen de alimento a la red (Pohlman *et al.*, 1997; Iliffe y Bishop, 2007; Bishop e Iliffe, 2012; Neisch *et al.*, 2012; Chávez, 2015). Los invertebrados anquihalinos son comúnmente polívoros no especializados, lo cual se considera como una medida adaptativa para soportar la escasez de alimento y tienen una elevada eficiencia para asimilar energía y un metabolismo reducido. Las tramas tróficas en estos sistemas son simples y se caracterizan por tener pocos niveles, optimizando la transferencia de energía al pasar de un nivel a otro (Bishop e Iliffe, 2012; Benítez, 2014; Chávez, 2015).

La adaptación de las especies es un problema central en la biología evolutiva y un tema extraordinario para la investigación en la ecología de aguas profundas y aguas subterráneas. Los animales que habitan en las cuevas anquihalinas muestran evidentes adaptaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, ontogénicas y etológicas (Ilfie y Bishop, 2007; Bishop e Ilfif, 2012). Las adaptaciones de los organismos para consumir el alimento disponible son el desarrollo de cerdas o cepillos en los apéndices o elaboradas estructuras de percepción, químicas y mecánicas, para detectar pequeñas concentraciones de aminoácidos, alimento, refugio, depredadores y congéneres (Mejía-Ortíz *et al.*, 2013). Las tallas pequeñas, morfología vermiforme, reducción o ausencia de pigmentación, la reducción ocular o pérdida total de los ojos y la hipertrofia de los órganos sensoriales son algunos otros ejemplos de adaptaciones a estos ecosistemas (Bishop *et al.*, 2004; Mejía-Ortíz, 2006; Ilfif y Bishop, 2007; Bishop e Ilfif, 2012; Benítez, 2014).

Las comunidades anquihalinas están conformadas por diversos grupos taxonómicos, sin embargo, están dominadas por crustáceos estigobios, este es un grupo diversificado y abundante que además de habitar sistemas de cuevas anquihalinas, habitan mar profundo y otros hábitats intersticiales, por lo anterior han sido usados como modelos para ejemplificar la adaptación de los animales a la vida en total oscuridad y poca disponibilidad de alimento (Escobar *et al.*, 2002; Bishop *et al.*, 2004; Ilfif y Bishop, 2007; Benítez, 2014). Algunas especies de crustáceos de los géneros *Tulumella* y *Typhlatya* presentan apéndices modificados, esto les permite filtrar partículas muy finas (Ilfif y Kornicker, 2009) y para los decápodos en general estas modificaciones pueden incluir incremento en la cantidad de setas y alargamiento de apéndices sensoriales.

Los crustáceos estigobios muestran una extensa distribución a través de latitudes tropicales y subtropicales, con patrones muy peculiares en tierras continentales y en islas que se encuentran en medio de los océanos. Este patrón se repite en muchos grupos taxonómicos de crustáceos como son los remipedios, termosbaenáceos, anfípodos, isópodos, decápodos, copépodos y ostrácodos (Bishop *et al.*, 2004; Ilfif y Bishop, 2007; Botello *et al.*, 2012).

Rutas de colonización de ambientes anquihalinos

Se han propuesto diversas teorías para explicar las rutas de colonización y el origen de los taxa de crustáceos que habitan ambientes anquihalinos, ya que no deja de sorprender el patrón de distribución que muestran muchas de estas especies, encontrándose en localidades aisladas en lados opuestos del océano Atlántico, así como en el Mediterráneo y en el Pacífico. Por lo anterior, se consideran organismos relictos del mar de Tetis, que se comenzó a formar en el Mesozoico tardío y el Terciario. En general, las teorías se dividen en procesos biológicos o geológicos.

Procesos geológicos

Modelo de vicarianza

Este modelo indica que la tectónica de placas sirvió como un mecanismo de separación o fragmentación de los taxa, y apunta a la fragmentación del mar de Tetis como el evento clave, ya que en este mar vivían las poblaciones ancestrales. La vicarianza jugó un papel importante en la distribución de la fauna anquihalina, sin embargo, esto no explica del todo patrones de distribución biogeográfica discontinua, como en las islas que surgieron después de ese evento como Ascensión o Bahamas que se hallan en lo que ahora es el océano atlántico (Hunter *et al.*, 2008; Iliffe y Kornicker, 2009; Botello *et al.*, 2012).

Modelo de regresión

Sugiere que los ancestros marinos de estos crustáceos estigobios quedaron varados por medio del levantamiento tectónico o descenso del nivel del mar y que se adaptaron a condiciones de agua salobre. Sin embargo, algunas cuevas recientemente inundadas aproximadamente hace 10,000 años y que ahora están colonizadas, sugieren que hubo migraciones posteriores (Iliffe y Bishop, 2007; Hunter *et al.*, 2008; Iliffe y Kornicker, 2009).

Procesos biológicos

Origen del mar profundo

Intentan explicar el origen y edad de dichos taxa estigobios, como que fueron especies originadas de ancestros que habitaban el bentos marino cercanos a los hábitats de las actuales cuevas y que las rutas de migración debieron ser por corredores creviculares. Esta hipótesis puede ser sustentada por algunos caracteres morfológicos similares entre estigobios y organismos que habitan el mar profundo y explicaría la colonización de organismos estigobios en zonas que emergieron recientemente. (Hunter *et al.*, 2008; Botello *et al.*, 2012).

Modelo de migración activa

Describe la dispersión oceánica de los organismos adultos, ya sea de forma activa o bien por corrientes, a través de ambientes continuos en el piso oceánico en aguas profundas, entre cuevas de islas o continentes que han llevado a los organismos a colonizar nuevos espacios siguiendo ciertas rutas (Ilfie y Bishop, 2007; Hunter *et al.*, 2008).

Modelo de migración pasiva

Sugiere la dispersión de larvas, postlarvas o en taxa carentes de estos estadios, por corrientes, animales, algas u objetos flotantes. Sin embargo, este modelo de dispersión es poco probable para especies que tienen poca resistencia a cambios fisiológicos (Ilfie y Bishop, 2007; Hunter *et al.*, 2008; Botello *et al.*, 2012).

Género *Typhlatya*

El género *Typhlatya* Creaser 1936, incluye decápodos carídeos perteneciente a la familia Atyidae (Álvarez *et al.*, 2005), son de los organismos invertebrados más abundantes en los sistemas anquihalinos en el mundo, y hasta la fecha no han sido reportados en mar abierto. Con 17 especies descritas, su distribución abarca desde el mar Mediterráneo occidental hasta el Golfo de México, pasando por islas como Bermudas, Puerto Rico, Barbuda y Cuba en el Caribe, Bahamas y la Ascensión en el Atlántico, y también se ha reportado una especie en el Pacífico en las islas Galápagos (Fig. 1, Tabla 1), sin embargo, estudios genéticos muestran que *Typhlatya* podría ser un género polifilético, debido la

posición de *T. galapagensis* y *T. monae* con respecto al resto de las especies, por no descender del mismo ancestro común (Botello *et al.*, 2012).

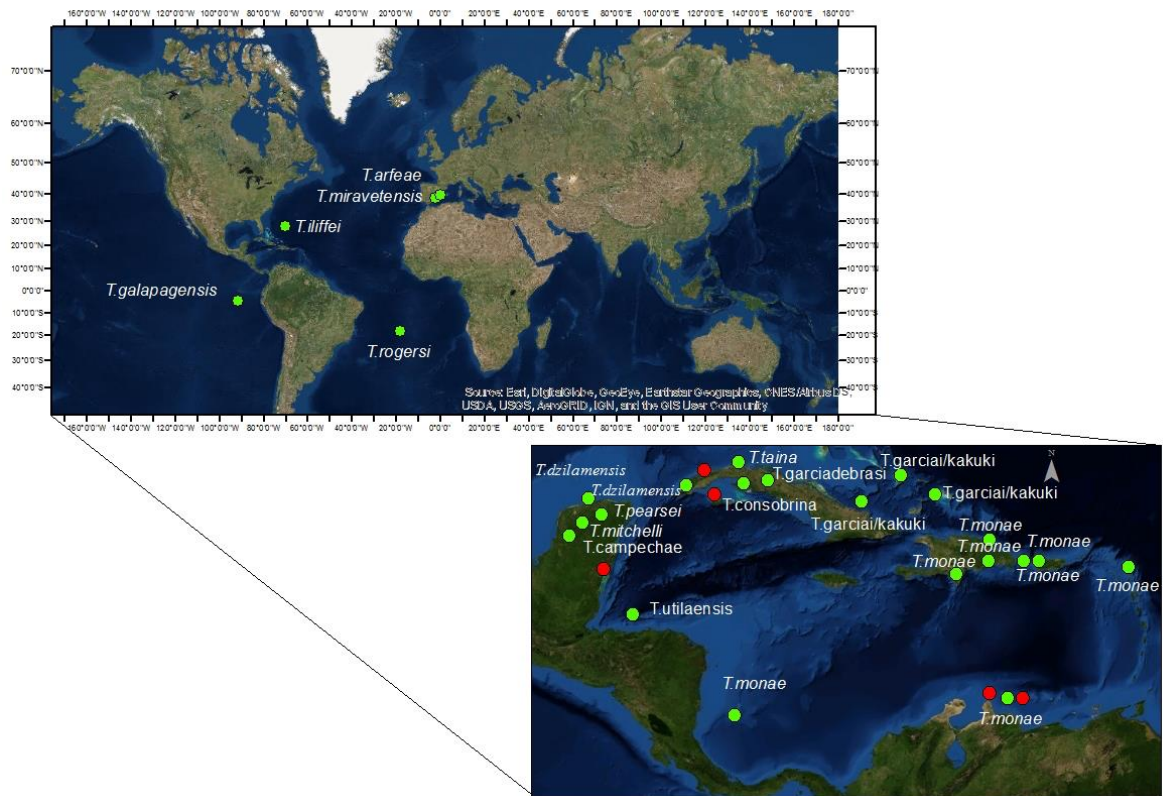


Figura 1. Mapa de distribución mundial del género *Typhlatya*. Los círculos rojos corresponden a poblaciones cuya identificación sigue pendiente y son reconocidas por el momento como *Typhlatya* sp. Modificado de Botello *et al.* (2012).

En los sistemas anquihalinos, este género en particular se ha encontrado por encima y por debajo de la haloclina o incluso en esta zona de transición, dependiendo de las preferencias de cada especie y sus adaptaciones. La especialización observada en el alto número de setas en los apéndices, ejemplifica el éxito en el aprovechamiento de recursos energéticos en ese ambiente por parte de estos individuos, siendo capaces de atrapar materia orgánica particulada presente en el medio. Existe abundancia reducida de estas

especies en conductos de cuevas y se presenta una abundancia mayor en algunas áreas de las cuevas, como zonas de penumbra o zonas en donde se acumula materia orgánica en suspensión (Cruz, 2008).

Género *Typhlatya* en México

En México, los sistemas anquihalinos localizados en la península de Yucatán son de suma importancia debido a que son de los más extensos en el mundo, un ejemplo de ello es el sistema Ox Bel Ha con más de 180 Km de pasajes y 130 cenotes reportados hasta el momento. Las especies del género *Typhlatya* tienen importancia ecológica en los cenotes de la península de Yucatán, donde han sido encontradas cuatro especies descritas hasta la fecha, *T. pearsei* Creaser, 1936; *T. campecheae* Hobbs y Hobbs; 1976, *T. mitchelli* Hobbs y Hobbs, 1976 y *T. dzilamensis* Álvarez, Iliffe y Villalobos, 2005. Estas especies son abundantes en sus hábitats, se pueden encontrar en cavernas y/o cenotes a diferentes profundidades (dependiendo de la especie) nadando en la columna de agua, colgando de las paredes o reposando a nivel de sustrato. Se alimentan principalmente de partículas orgánicas, bacterias, algas y restos de animales muertos. Son presa común de otros crustáceos como remipedios y creaserias (Álvarez *et al.*, 2005; Cruz, 2008; Benítez, 2014; Chávez, 2015) (Fig. 2).

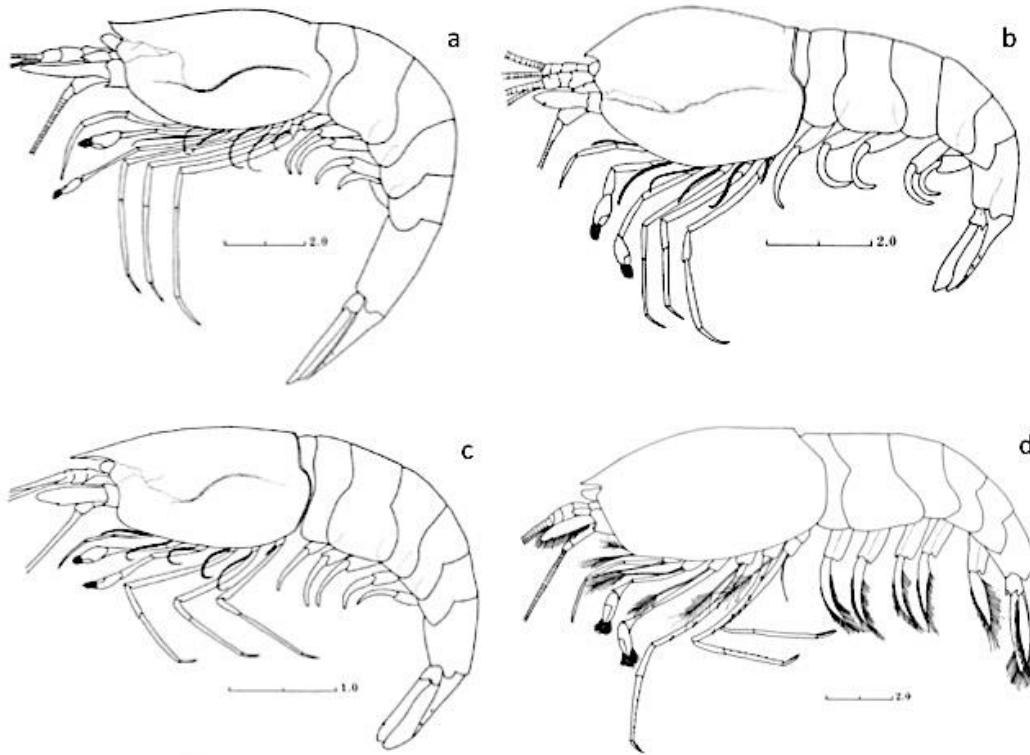


Figura 2. Especies del género *Typhlatya* de la península de Yucatán, México. a) *T. mitchelli*; b) *T. campecheae*; c) *T. pearsei*; d) *T. dzilamensis*. Tomado de Hobbs y Hobbs (1976) y Álvarez *et al.* (2005). Las antenas y anténulas no se muestran completas.

Typhlatya mitchelli

La distribución de esta especie ocupa una gran área dentro de la península de Yucatán, encontrándose desde el suroeste de Mérida, Yucatán, hasta el oeste de Quintana Roo. El hábitat de esta especie lo comprenden pozas someras de agua dulce en las áreas oscuras de cenotes y cuevas sumergidas. También se le puede encontrar en las zonas de entrada a las cuevas recibiendo luz directa por periodos cortos de tiempo.

Typhlatya mitchelli alcanza tallas de hasta 16 mm de longitud total, presenta caparazón liso, sin espinas, lóbulo antenal evidente, surco hepato-branquiocardiaco discernible. Rostro corto, acuminado en vista dorsal, dirigido hacia arriba, espiniforme y no alcanza el margen distal de los ojos. Pleuras de las primeras cinco somitas abdominales con el ángulo posterolateral redondeado, sexta somita abdominal aproximadamente dos veces más larga que la quinta. Todos los pereiópodos con exópodos, el del quinto par reducido. Primer par de pereiópodos con el carpo aproximadamente de la misma longitud que el

isquio y mero combinados, ligeramente más largo que la quela. Segundo par de pereiópodos con el carpo dos veces más largo que la quela, y cerca de la misma longitud que el isquio y mero combinados. Dos pares de espinas y dos pares de setas espiniformes en el margen distal del telson. En general, el cuerpo carece de pigmentos, sin embargo, existe una población pigmentada que se presenta sólo en algunas localidades. Ojos reducidos, carentes de facetas y pigmentos (Álvarez e Iliffe, 2008) (Fig. 2a). Esta especie está clasificada como amenazada dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Typhlatya campecheae

Esta especie se conoce únicamente para dos localidades en el estado de Campeche, encontrándose en cenotes someros, menores a 1.5 m de profundidad.

El tamaño máximo es de 12 mm de longitud total en machos y 13.5 mm en hembras. *Typhlatya campecheae* se distingue del resto de las especies de la península por presentar caparazón globoso; rostro triangular en vista dorsal, apenas alcanzando el margen distal del primer segmento antenular, más allá de los ojos; pleura de las tres primeras somitas abdominales redondeadas, la de la cuarta subaguda, la de la sexta aguda; la longitud de la sexta somita abdominal es el doble de la quinta. Presencia de exópodos en todos los pereiópodos. El cuerpo carece de pigmentos, ojos reducidos sin facetas y sin pigmentos (Álvarez e Iliffe, 2008) (Fig. 2b). Esta especie ha sido clasificada como en peligro de extinción dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Typhlatya pearsei

Es la especie de átido más ampliamente distribuido dentro de la península de Yucatán encontrándose en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo. El hábitat de esta especie está conformado por pozas someras de agua dulce en las áreas oscuras de cenotes y cuevas sumergidas, aunque también se le puede encontrar en las zonas de entrada a las cuevas, recibiendo luz directa por periodos muy cortos de tiempo. Esta especie ha sido observada nadando en la capa marina y la dulce en el cenote Crustacea (Mejía-Ortíz *et al.*, 2013).

Typhlatya pearsei presenta caparazón liso, sin espinas. El rostro es acuminado, alcanzando de la región media a la porción distal del segundo artejo del pedúnculo

antenualar. El margen anterior del caparazón exhibe un evidente lóbulo antenal y lateralmente el surco branquiocardiaco. Pleuras de las primeras tres somitas abdominales redondeadas, las de la cuarta somita subagudas, las de la quinta somita agudas, sexta somita abdominal menos de dos veces la longitud de la quinta. Todos los pereiópodos con exópodos, los del quinto par reducidos. Primer par de pereiópodos con el carpo 0.8 veces la longitud del isquio y mero combinados, y de aproximadamente la misma longitud que la quela. Segundo par de pereiópodos con el carpo 1.5 veces el largo tanto del mero como de la quela (Álvarez e Iliffe, 2008). El cuerpo es translúcido, sin pigmentos, mientras que los ojos están reducidos y carecen de facetas y pigmentos (Fig. 2c). Esta especie alcanza tallas de hasta 17 mm de longitud total y ha sido clasificada como amenazada dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Typhlatya dzilamensis

Esta especie se conoce únicamente para tres cenotes en el estado de Yucatán. Se localiza en un área donde no se encuentran otras especies del género, además ha sido recolectada en localidades con niveles de salinidad marina, en contraste con las otras especies de *Typhlatya* de la península de Yucatán que son típicamente dulceacuícolas.

Su tamaño varía de 19.4 a 24.2 mm, la hembra es más grande que el macho. El rostro carece de dientes, orientado anteriormente, alcanzando el margen distal de los ojos, triangular en vista dorsal. Caparazón liso, carente de espinas. Ojos reducidos, no pigmentados. Primer par de pereiópodos con el exópodo alcanzando el tercio proximal del propodio, carpo ahuecado distalmente, 2.5 veces más largo que el ancho máximo. Segundo par de pereiópodos más largo y esbelto que el primero; exópodo alcanzando el margen distal del mero. Rostro dirigido hacia el frente, alcanzando el margen distal de los ojos, triangular en vista dorsal presenta tres pares de espinas y dos pares de setas sobre el margen distal del telson (Álvarez e Iliffe, 2008) (Fig. d). Esta especie no aparece en el listado de la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Tabla 1. Especies descritas del género *Typhlatya* y su distribución. Modificada de Botello *et al.* (2012).

Espece	Distribución
<i>T. arfeae</i> Jaume y Bréhier, 2005	Francia
<i>T. campecheae</i> Hobbs y Hobbs, 1976	Campeche (México)
<i>T. consobrina</i> Botosabeanu y Holthuis, 1970	Cuba
<i>T. dzilamensis</i> Álvarez, Iliffe y Villalobos, 2005	Yucatán (México)
<i>T. elenae</i> Juarrero de Varona, 1994	Cuba
<i>T. galapagensis</i> Monod y Cals, 1970	Isla Galapagos
<i>T. garciadebrasi</i> Juarrero y Ortiz, 2000	Cuba
<i>T. garciai</i> Chace, 1942	Cuba e isla Caicos
<i>T. iliffei</i> Hart y Manning, 1981	Bermudas
<i>T. kakuki</i> Álvarez, Iliffe y Villalobos, 2005	Bahamas
<i>T. miravetensis</i> Sanz y Platvoet, 1995	España
<i>T. mitchelli</i> Hobbs y Hobbs, 1976	Península de Yucatán (México)
<i>T. monae</i> Chase, 1954	Colombia, Puerto Rico, Antillas, República Dominicana, Barbuda (Caribe)

<i>T. pearsei</i> Creaser, 1936	Península de Yucatán (México)
<i>T. rogersi</i> Chase y Manning, 1972	Isla Ascención (Atlántico)
<i>T. taina</i> Estrada y Gómez, 1987	Cuba
<i>T. utilaensis</i> Álvarez, Iliffe y Villalobos, 2005	Honduras

Estudios genéticos

Durante la primera parte del siglo XX se dio el desarrollo teórico de la genética de poblaciones, ya se sospechaba que la variación genética en determinadas poblaciones naturales podría ser útil en estudios taxonómicos y ecológicos (Eguiarte *et al.*, 2007). A partir del desarrollo de una técnica: la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) en 1988, se permitió conocer las secuencias de nucleótidos en el ADN y la verdadera variación genética en las poblaciones naturales (Botello, 2008). La finalidad de esta técnica es sintetizar muchas veces una región específica del ADN en condiciones de laboratorio (previamente a la PCR se debe extraer el ADN del organismo) y se eligen precursores de la región específica a sintetizar llamados *primers* o *cebadores* para que se inicie la amplificación, así como los deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y la *Taq* polimerasa, enzima responsable de añadir los dNTPs a la cadena naciente que trabaja a altas temperaturas, esto es posible mediante el empleo de termocicladoras, que son máquinas que hacen cambios precisos en la temperatura de las muestras, incrementándola o disminuyéndola en varios ciclos a fin de desnaturalizar las dobles cadenas de ADN, permitiendo que la polimerasa añada nucleótidos. Esta técnica tiene muchas aplicaciones en biología molecular que van desde la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense (Eguiarte *et al.*, 2007).

El genoma mitocondrial o mtADN tiene un tamaño de 15 a 17 Kb (Eguiarte *et al.*, 2007), Los animales en general tienen un total de 37 genes mitocondriales, algunos de los

cuales han resultado de gran utilidad en estudios de variación genética y han sido ampliamente usados debido a su corta longitud de ADN, son altamente variables (más que los genes nucleares) y la manera en que se heredan los genes mitocondriales es por vía materna, por lo tanto no recombinan, esto facilita su rastreo en el tiempo. Aunado a lo anterior, tienen un pequeño número de mecanismos de reparación de mutaciones. Los genes mitocondriales como el Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI), el citocromo b (Cyt b) y el 16S ARNr han sido ampliamente utilizados en diversos estudios para describir variación genética, realizar análisis filogenéticos y filogeográficos, además de estudiar aspectos sobre la evolución de muchas especies incluyendo los crustáceos de cuevas.

Los análisis basados en secuencias del gen COI han mostrado una alta resolución y capacidad, en algunos casos, hasta del 100% en identificar correctamente ciertos organismos desde niveles como phylum hasta especies, tal es el caso del estudio que realizó Hebert *et al.* (2003) en el cual el 96.4% de individuos fueron correctamente agrupados a nivel de phylum, el 100% de órdenes de hexápodos fueron correctamente agrupados y el 100% de especies pertenecientes al orden Lepidoptera fueron correctamente identificados. Los autores comentan que los individuos que no fueron correctamente agrupados en su phylum fue debido a que el perfil filogenético en bases de datos tenía un tamaño limitado, así como la diversidad de estos phylum era limitada. Los autores proponen al gen COI como un buen candidato para identificar especies y usarlo como código de barras debido a que tiene una alta tasa de evolución molecular que incluso permite discriminar especies estrechamente relacionadas que han divergido recientemente y poblaciones geográficas dentro de una misma especie, los primers universales para este gen son robustos, tiene mayores señales filogenéticas que otros genes mitocondriales y que la tercera posición del codón muestra una alta incidencia de substitución de bases, al igual que muchos otros genes que codifican proteínas. Sus resultados arrojan para vertebrados un 2% de divergencia en la secuencia de COI mientras que para especies de lepidópteros un 3% (Hebert *et al.* 2003).

ANTECEDENTES

Creaser (1936) erigió el género *Typhlatya* y lo describe con *T. pearsei* de la península de Yucatán como la especie tipo. A partir de esta publicación otras cinco especies de sistemas anquihalinos alrededor del mundo fueron descritas entre 1942 y 1972 . Posteriormente Hobbs y Hobbs (1976), describieron dos especies más para la región de la península de Yucatán: *T. campecheae* y *T. mitchelli* aumentando a ocho especies descritas para este género. Posterior a esta fecha, se recolectaron y describieron nuevas especies provenientes de Cuba, Bermudas, Bahamas y España. En 2005 aparecieron dos publicaciones en las que se describen nuevas especies de *Typhlatya*, una de Jaume y Bréhier (2005) y otra de Álvarez *et al.* (2005), en esta última se describen tres nuevas especies de diferentes localidades, destacando *T. dzilamensis* para la península de Yucatán, siendo esta la cuarta especie localizada en México.

En cuanto a estudios filogenéticos, son tres los que sobresalen para el género, el primero fue realizado por Webb (2003) con dos especies de la península de Yucatán *T. mitchelli* y *T. pearsei*, este autor utilizó tres genes mitocondriales, el Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), el citocromo b (Cyt b) y el 16S ARNr. Su objetivo fue identificar la variación de las diferentes poblaciones de *T. mitchelli* y colocó como grupo externo a *T. pearsei*. En su análisis se diferencian ambas especies genéticamente. Cabe destacar que en su investigación, reconoce una cuarta especie de *Typhlatya* no descrita y la nombra como Unidad Evolutivamente Significativa (ESU por sus siglas en inglés) proveniente del cenote San Antonio Chiich en Yucatán. De sus resultados el gen más variable para *T. mitchelli* fue el Cyt b con 11 sitios variables que produjeron cuatro sustituciones de aminoácidos. El análisis no reveló una estructuración geográfica, lo que significa que no había una diferenciación genética en las distintas poblaciones que se analizaron con base en este gen, en este caso no se podría hablar de haplotipos. El segundo gen más variable fue el COI con siete sitios que no causaron cambios de aminoácidos. Mientras que para el 16S hubo dos sitios variables de nucleótidos. Con base en las distancias pareadas generadas por los datos del Cyt b para *T. mitchelli* y *T. pearsei* y una tasa de evolución molecular, se estimó que el ancestro común para ambas especies existió hace 8.3 – 13.5 millones de años (m.a.) mientras que con base en las secuencias del 16S el tiempo se reduce a 4.8 – 8.3 m.a. Al

promediar los datos, el tiempo estimado del último ancestro común para estas dos especies es de 7 – 10 m.a. *T. mitchelli* y la ESU mostraron un último ancestro común hace 2 – 7 m.a.

El segundo estudio, realizado por Hunter *et al.* (2008), consistió en un análisis filogenético e historia biogeográfica de cinco especies de *Typhlatya* del mar Caribe y oeste del Atlántico: *T. mitchelli*, *T. pearsei*, *T. garciai*, *T. iliffei* y *Typhlatya* sp. En este estudio se analizaron secuencias parciales de los genes mitocondriales 16S ADNr, Cyt b y COI. El análisis muestra una relación de grupos hermanos de las dos especies de la península de Yucatán *T. mitchelli* y *T. pearsei*, además de que arroja una tercera especie bien diferenciada de las dos anteriores, aún no descrita, pero que también se encuentra cercanamente emparentada con *T. mitchelli*; los autores la nombraron como ESU y es la misma secuencia publicada por Webb (2003), mencionan que esta especie, que hasta la fecha no ha sido descrita, habita en agua dulce y tiene gran similitud morfológica con *T. pearsei*,

La estimación de los tiempos de divergencia para los taxa de Yucatán, indican una reciente separación de *T. pearsei* del clado formado por *T. mitchelli* y *Typhlatya* sp. de 22 – 31 m.a., y para *T. mitchelli* de *Typhlatya* sp aproximadamente de 7 – 9 m.a., usando el gen 16S. Empleando el gen COI los datos arrojaron una divergencia de 9 – 16 m.a. entre *T. pearsei* y *T. mitchelli*. Las cinco especies analizadas resultaron monofiléticas. Las estimaciones de divergencia genéticas también indicaron que las especies de agua dulce de Yucatán se originaron antes de la formación de los hábitats dulceacuícolas de cuevas en esta península en las que hoy habitan, las cuales se estima tienen una antigüedad no mayor de 24 millones de años (Vázquez-Domínguez y Arita, 2010). Esto podría significar que las especies pudieron haber habitado cavidades marinas en regiones cercanas a Yucatán o al Caribe, entre el Plioceno tardío y el Pleistoceno temprano, y subsecuentemente migraron una vez que se formaron las cuevas en la península.

En un tercer estudio realizado por Botello *et al.* (2012) analizaron 13 de las 18 especies del género *Typhlatya* empleando seis genes, tres mitocondriales y tres nucleares. Es el estudio más completo hasta la fecha, estos autores determinaron que el grupo es polifilético la posición de *T. galapagensis* como especie hermana de *Antecaridina lauensis*

y no con el resto de *Typhlatya*. Además, el género *Stygiocaris* aparece anidado dentro de *Typhlatya*. Otro aspecto importante de su trabajo es la clara diferenciación de tres especies de la península de Yucatán, *T. dzilamensis*, *T. mitchelli* y *T. pearsei*, y la conformación de un grupo monofilético (Fig. 3).

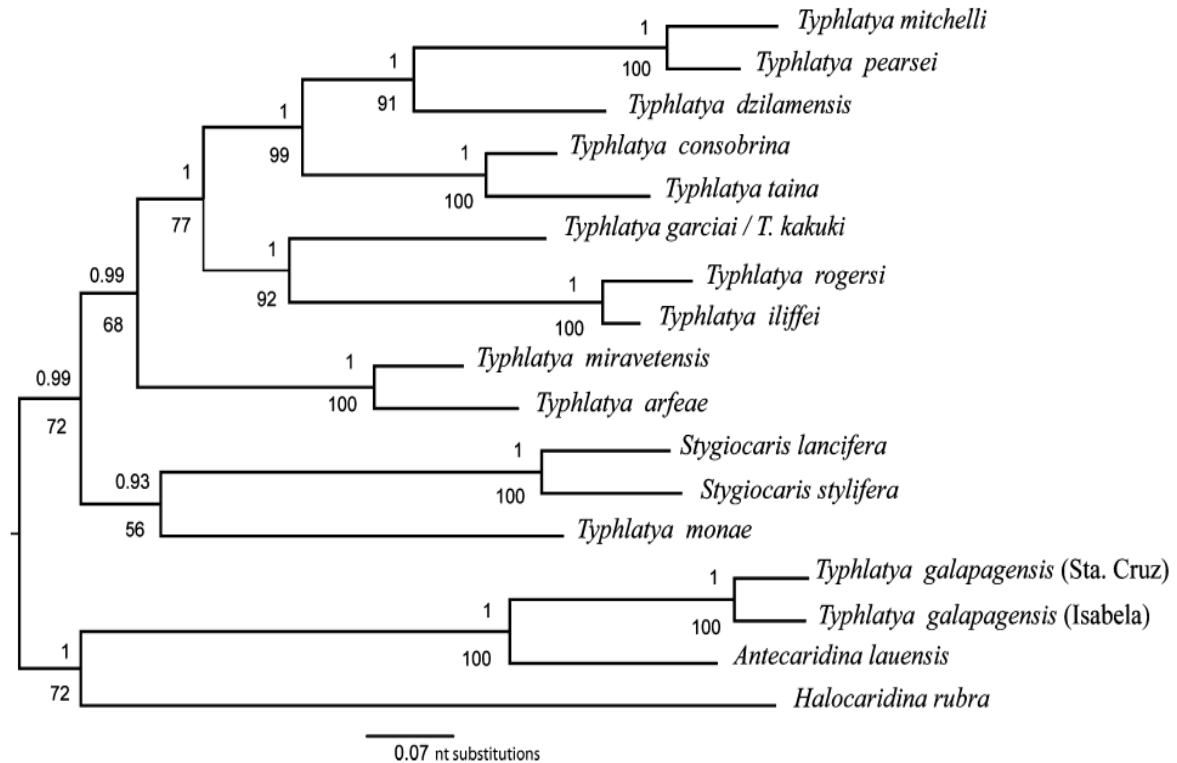


Figura 3. Filogenia derivada del análisis bayesiano que muestra las relaciones existentes entre especies de *Typhlatya*. Los valores por abajo en los nodos corresponden a soportes de rama de bootstrap de un análisis de máxima verosimilitud y los valores por encima en los nodos corresponden a las probabilidades posteriores del análisis bayesiano. Tomado de Botello *et al.* (2012).

A pesar de esfuerzos previos, hasta la fecha en ningún trabajo filogenético se han incluido las cuatro especies mexicanas del género *Typhlatya* y una posible quinta (ESU), debido a que no ha sido posible secuenciar material genético de *Typhlatya campecheae*.

JUSTIFICACIÓN

Aunque existen trabajos previos que abarcan aspectos morfológicos y geográficos de las especies de *Typhlatya* en la península de Yucatán, son pocos los trabajos basados en marcadores moleculares y en ninguno de estos han sido incluidas las cuatro especies descritas para la región. Los datos que se generarán en este estudio facilitarán la integración y dilucidación de las relaciones de parentesco existentes entre estas especies. La información genética, además de otros datos relevantes tales como hábitos, distribución geográfica y posibles eventos de vicarianza, serán de utilidad para el planteamiento de una hipótesis que ayuden a explicar el origen, dispersión y la colonización del género *Typhlatya* en la región.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la variación genética en las especies del género *Typhlatya* de la península de Yucatán, México, incluyendo todas las especies descritas y los ejemplares colectados para esta tesis, explorando la existencia de nuevas especies.

Objetivos particulares

1. Estimar la variación genética del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad 1 (COI) de organismos provenientes de cuatro cenotes de Quintana Roo.
2. Investigar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Typhlatya* en México.
3. Analizar la relación existente entre la distribución de las especies dentro del Sistema Ox Bel Ha (SOBH) y su variabilidad genética.
4. Integrar la variación morfológica y genéticas de las especies de este género con el fin de proponer un número total de especies en el área.

ÁREA DE ESTUDIO

El estado de Quintana Roo se localiza en la región este de la península de Yucatán, México, con coordenadas 20° 11´ y 20° 17´ latitud Norte y 87° 29´ longitud Oeste. La región continental de Quintana Roo está conformada por roca caliza de la era Cenozoica; está cubierta por bosque tropical caducifolio (Benítez, 2014). Esta región tiene un clima sub-húmedo tropical, la temperatura ambiente media anual es de 26° C y la precipitación anual es de 1,500 mm (Smart *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2011).

El área de estudio se encuentra en la parte sureste del estado de Quintana Roo, los cenotes donde fueron recolectados los organismos pertenecen al Sistema Ox Bel Ha (SOBH), localizado al sur del poblado de Tulum (Fig. 4). Se han identificado tres conexiones del SOBH con el mar en diferentes puntos de la costa, teniendo interacción con el mar Caribe. En 2016, de acuerdo al Quintana Roo Speleological Survey el SOBH tenía una longitud de cavernas de 270.1 km y 143 cenotes.

Dentro del SOBH, en la región el Naranjal, se seleccionaron cuatro cenotes como sitios de muestreo perpendiculares a la costa, separados entre sí por más de dos kilómetros. El primero y más cercano a la zona costera es el cenote Támano o Na'hach Wennen Ha (20°10'08.1" N, 87°27'22.7" O); el segundo cenote es Odyssey (20°10'26.4" N, 87°28'14.6" O); el tercero Jail House o Muknal (20°11'18.7" N, 87°29'24.3" O); el cuarto y más alejado de la costa es el cenote Bang (20°12'37.6" N, 87°30'04.1" O) a una distancia de 12 km de la costa (Fig. 5). Este transecto se encuentra en el ramal norte del SOBH.

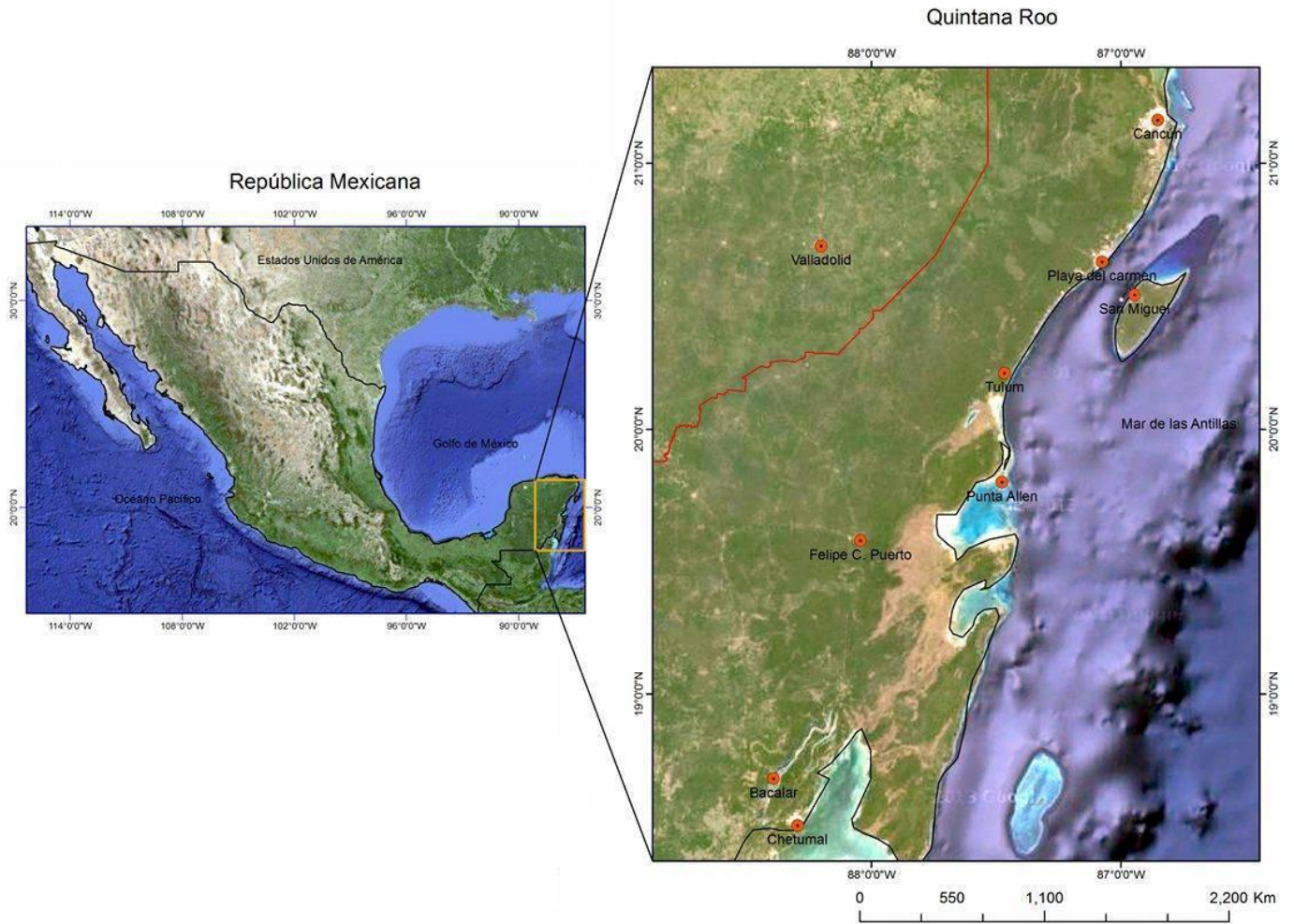


Figura 4. Área de estudio. A la izquierda se muestra el mapa del territorio mexicano; a la derecha se muestra un acercamiento que corresponde al estado de Quintana Roo, donde se encuentra el Sistema Ox Bel Ha.

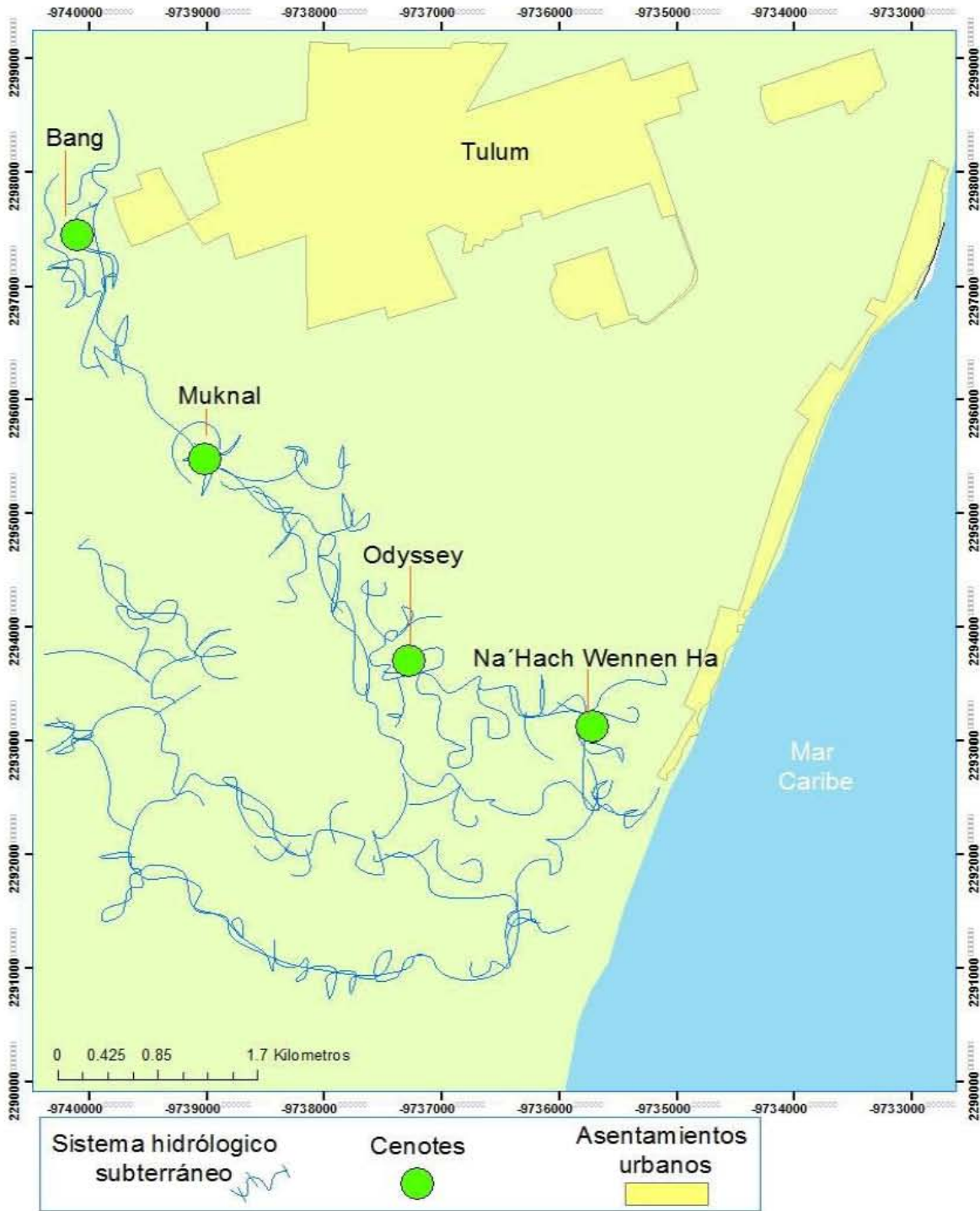


Figura 5. Sistema Ox Bel Ha en la región el Naranja; los círculos verdes representan los sitios de muestreo. Modificado de Benítez (2014).

MATERIAL Y MÉTODO

Colecta de los organismos

Se realizaron tres muestreos en febrero, julio – agosto y diciembre de 2013. Los cenotes en los que se realizó dicho muestreo dan acceso a galerías sumergidas.

En cada punto se realizaron dos inmersiones llevadas a cabo por buzos especializados en cavernas con equipo técnico para dicha actividad. Las inmersiones duraron alrededor de 1.45 horas, con la misma ruta dentro de cada cenote, trazada previamente con una línea guía. Se realizó un perfil de la columna de agua considerando los siguientes parámetros: profundidad, pH, salinidad y concentración de oxígeno disuelto con ayuda de una Sonda Multiparamétrica DataSondex 5X (hydrolab).

Para las inmersiones se ocuparon lámparas con luz blanca en las cuevas de los cenotes; fueron requeridos tres tanques por buzo, con una concentración de gases especial para dicha actividad y tiempo, así como una línea guía para dirigir el trayecto y viales para la recolecta organismos; las muestras fueron etiquetadas con fecha, lugar y profundidad. Una vez en tierra, se transfirieron a viales de vidrio o plástico que contenían alcohol al 96% con el fin de fijar y preservar los organismos para su posterior identificación en el laboratorio. El material recolectado fue trasladado y depositado en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR) del Instituto de Biología, UNAM.

Análisis morfológico

En la CNCR fueron revisados los organismos con ayuda de un microscopio Zeiss (con aumentos 2x y 5x). Las claves taxonómicas que sirvieron como apoyo para la identificación de los ejemplares fueron las de Hobbs y Hobbs (1976) y Álvarez *et al.* (2005); los ejemplares que no fue posible identificar a nivel de especie fueron nombrados como *Typhlatya* sp.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

El ADN total fue extraído del músculo del cefalotórax, en los individuos de talla muy pequeña fue necesario colocar el organismo completo. El tejido fue digerido con 20µL de Proteinasa K llevada a un volumen final de 1.25ml y a una temperatura de 56°C durante toda la noche; la extracción se realizó de acuerdo con el protocolo del kit DNeasy® de QIAGEN®. La cantidad y calidad de ADN fue evaluada con el uso del NanoDrop 2000 Spectrophotometer de Thermo Scientific. Se amplificó un fragmento del gen COI por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los *primers* LCO1490 (5'- GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3') y HCO2198 (5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA -3') (Folmer *et al.*, 1994). Todas las reacciones de PCR fueron corridas con un control negativo para corroborar que no hubiese ocurrido alguna contaminación.

La PCR se realizó con 0.8 – 3 µL de la muestra de ADN, 9.47 µL de H₂O, 1.25 µL de buffer, 0.5 de MgCl₂, 0.25 µL de dNTP, 0.2 µL de cada primer, 0.5 de BSA y 0.12 de BIOTAQ™ DNA polymerase, el programa de amplificación utilizado es presentado en la Tabla 2. Para verificar la obtención de ADN amplificado, se realizaron electroforesis sobre geles de agarosa al 1% por 30 minutos a 110 V y 500 mA. Los productos de PCR fueron teñidos con RedGel y visualizados en un UV transiluminador UVP de Kodak®. Las fotografías de los geles se tomaron con la cámara integrada a este transiluminador, el análisis de las fotografías fue con el software de dicha cámara.

Tabla 2. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen COI.

Paso	T (°C)	Tiempo	Acción
1	94	2-5 min	Desnaturalización
2	94	30-45 s	Desnaturalización
3	44-50	30-45 s	Alineamiento
4	72	1 min	Extensión
Ir al paso 2 y repetir 35 veces			
5	72	10 min	Extensión
6	4	∞	

Los productos de PCR se purificaron en las columnas Amicon Ultra 0.5 mL de Merck Milipore® siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Posteriormente se realizó la reacción de secuencias en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5') utilizando un protocolo estándar (Tabla 3) con el kit ABI Prism BygDye v 2.0 Terminador y los primers respectivos utilizados en la PCR; la cantidad del producto de PCR fue de 1.5 µL. Los productos de la reacción fueron purificados con columnas de Sephadex Centri Sep Spin Columns. El termociclador utilizado tanto en la PCR como en la reacción de secuencias fue el Eppendorf Mastercycler Gradient.

Las secuencias fueron obtenidas mediante un secuenciador automatizado de ADN 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud que se encuentra en el Instituto de Biología, UNAM.

Tabla 3. Programa utilizado en la reacción de secuenciación.

Paso	T (°C)	Tiempo	Acción
1	96	1 min	Desnaturalización
2 (x 25)	96	5 s	Desnaturalización
3 (x 25)	50	10 s	Alineamiento
4 (x 25)	60	4 min	Extensión
5	60	5 s	Extensión
6	4	∞	

Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas se editaron en el programa Chromas Lite 2.4.3, las secuencias fueron alineadas ClustalW a través de la interfase del programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2015), y posteriormente se verificaron a ojo. Al análisis se incluyeron secuencias de GenBank y como grupo externo se utilizó al átido *Halocaridina rubra* (Tabla 5).

Tabla 4. Especies incluidas en el análisis filogenético, se mencionan el número de acceso de GenBank, autores del estudio y localidad.

Especie	Acceso GenBank	Autor	Localidad
<i>Halocaridina rubra</i>	DQ399258	Santos 2006	Kohala District, Hawaii
<i>Typhlatya dzilamensis</i>	NC_035408.1	Jurado <i>et al.</i> 2017	Yucatán, México
<i>T. iliffei</i>	HE800904	Botello <i>et al.</i> 2012	Bermuda
<i>T. mitchelli</i>	HE800902	Botello <i>et al.</i> 2012	Yucatán, México
<i>T. mitchelli</i>	NC_035403	Jurado <i>et al.</i> 2017	Yucatán, México
<i>T. pearsei</i>	HE800903	Botello <i>et al.</i> 2012	Yucatán, México
<i>T. pearsei</i>	NC_035400.1	Jurado <i>et al.</i> 2017	Yucatán, México
<i>T. rogersi</i>	HE800908.1	Botello <i>et al.</i> 2012	Ascensión

Análisis filogenético

Dos métodos de inferencia filogenética fueron empleados: Máxima Verosimilitud (MV) e inferencia Bayesiana (IB). Para el análisis de MV, se determinó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a los datos utilizando jModelTest 3.7 (Posada, 2008), bajo el criterio de información de Akaike (AIC) siendo TPM3uf + I + G el modelo seleccionado. El análisis fue realizado en el programa RAxML v8.0.0; (Stamatakis, 2014) Se evaluó el soporte de los nodos por medio de bootstrap realizando 10,000 pseudoréplicas.

Para la IB, el análisis se realizó en el programa MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) mediante la ejecución de un algoritmo MCMC por 15,000,000 generaciones, muestreando un árbol cada 200 generaciones, con cuatro cadenas paralelas, utilizando un árbol generado al azar como punto de partida. Se utilizó el modelo de sustitución seleccionado por jModelTest. Un análisis preliminar muestra que una distribución estacionaria se alcanzó a las aproximadamente 10,000 generaciones, lo cual fue observado con el programa Tracer v.1.5.0 (Rambaut y Drummond, 2009). Se utilizaron estos valores como burn-in para la construcción del árbol y fueron desechados todos los árboles anteriores. Las probabilidades posteriores (PP) del análisis fueron determinadas por los árboles restantes. Se calculó el árbol de consenso del 50%. Los árboles obtenidos fueron visualizados y editados con el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2008).

Distancias genéticas

Para el análisis de las distancias del gen COI entre las secuencias de *Typhlatya* se utilizó el modelo de sustitución de distancia p, que no realiza ninguna corrección para las sustituciones múltiples, no toma en cuenta las transiciones y transversiones ni las tasas evolutivas en los sitios nucleótidos.

Tiempos de Divergencia

Se obtuvieron los tiempos de divergencia para las especies de *Typhlatya* de la península de Yucatán. Se utilizó un reloj molecular relajado con el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2015), para calibrar el reloj fue utilizado el tiempo estimado del último ancestro común de *T. mitchelli* y *T. pearsei* de 6 – 7 millones de años por Hunter *et al.* (2008) y Botello *et al.* (2012).

RESULTADOS

Análisis morfológico

Se recolectaron un total de 57 ejemplares del género *Typhlatya* por medio de inmersiones, todos los ejemplares fueron depositados en la CNCR. Se reconocieron tres especies: *Typhlatya dzilamensis*, *T. mitchelli* y *T. pearsei*, así como dos morfotipos que fueron nombrados *Typhlatya* sp. 1 y *Typhlatya* sp. 2. De los 57 ejemplares; 11 son *Typhlatya* sp. 1 y 15 *Typhlatya* sp. 2.

El carácter diagnóstico del género *Typhlatya* es el rostro, tanto su longitud como su posición. En el caso de *Typhlatya* sp. 1 miden aproximadamente 22 mm de longitud, el rostro es de un tamaño intermedio entre los de la especie *T. pearsei* y *T. mitchelli*; el rostro excede los ojos pero no alcanza el segundo artejo de la anténula como en *T. pearsei* y la sexta pleura tiene la misma longitud que la quinta (Fig. 6).

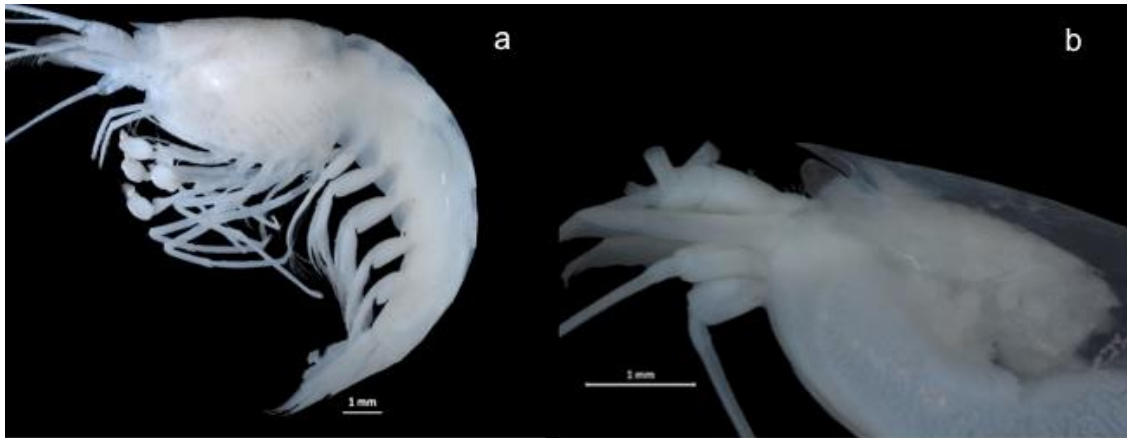


Figura 6. Fotografías de *Typhlatya* sp. 1 a) organismo completo b) acercamiento del cefalotórax.

Por otro lado los organismos de *Typhlatya* sp. 2 miden aproximadamente 19 mm de longitud, su forma es acuminada hacia abajo en vista dorsal metiéndose entre los ojos el rostro se prolonga más allá del margen distal de los ojos, en vista dorsal el rostro está entre ambos ojos con una marcada proyección en dirección a las anténulas y la sexta pleura tiene una longitud ligeramente mayor a la quinta (Fig. 7).

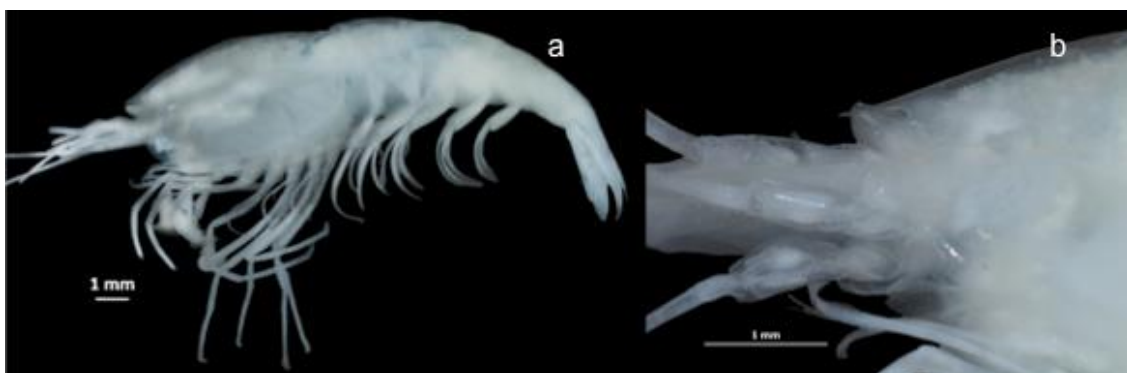


Figura 7. Fotografías de *Typhlatya* sp. 2 a) organismo completo b) acercamiento del cefalotórax.

Análisis molecular

De los 25 organismos destinados a secuenciar, se obtuvieron un total de 19 secuencias de un fragmento del gen COI con una longitud de 606 pares de bases (pb) ; para 6 organismos no fue posible obtener secuencias debido a mala calidad del ADN. Se obtuvieron además 3 secuencias del mismo gen de organismos que estaban depositados en la CNCR identificados como *Typhlatya campecheae*, *T. dzilamensis* y *T. pearsei*; las primeras dos especies habían sido recolectadas en la localidad tipo (Tabla 5). Se añadieron al análisis secuencias de otras dos especies descritas para la región, *T. mitchelli* y *T. pearsei*, estas secuencias se obtuvieron de la base de datos GenBank con número de acceso HE800902 y HE800903 respectivamente (Tabla 4).

Tabla 5. Ejemplares del género *Typhlatya* empleados para la obtención de secuencias de COI en el presente trabajo; el número de catalogo se refiere al asignado en la CNCR.

No. catálogo	Especie	Localidad	Fecha de Colecta	Símbolo
27969	<i>T. dzilamensis</i>	Bang	28/02/13	39b
27921	<i>T. dzilamensis</i>	Odyssey	26/02/13	2-41
27925	<i>T. dzilamensis</i>	Odyssey	26/02/13	2-50
28431	<i>T. dzilamensis</i>	Na'Hach Wennen Ha	03/08/13	4-6
	<i>Typhlatya</i> sp. 2	Odyssey	02/08/13	Rc1d
	<i>T. dzilamensis</i>	Odyssey	02/08/13	Rr17
28390	<i>T. dzilamensis</i>	Na'Hach Wennen Ha	03/08/13	4-35
28392	<i>T. dzilamensis</i>	Na'Hach Wennen Ha	03/08/13	4-27
28415	<i>T. dzilamensis</i>	Na'Hach Wennen Ha	03/08/13	4-3d
28590	<i>T. pearsei</i>	Odyssey	07/12/13	3-47
28581	<i>T. dzilamensis</i>	Odyssey	07/12/13	3-29
28585	<i>T. pearsei</i>	Odyssey	07/12/13	3-12
28588	<i>Typhlatya</i> sp. 2	Odyssey	07/12/13	3-11
28565	<i>Typhlatya</i> sp. 2	Odyssey	07/12/13	3-32
28589	<i>T. mitchelli</i>	Odyssey	07/12/13	3-51
28562	<i>T. dzilamensis</i>	Na'Hach Wennen Ha	08/12/13	4-12
28563	<i>Typhlatya</i> sp. 1	Na'Hach Wennen Ha	08/12/13	4-9
28586	<i>Typhlatya</i> sp. 1	Na'Hach Wennen Ha	08/12/13	4-32
28564	<i>Typhlatya</i> sp. 1	Na'Hach Wennen Ha	08/12/13	4-41

Se obtuvieron dos árboles filogenéticos (Fig. 8), resultado de un análisis de inferencia bayesiana (IB) y de Máxima Verosimilitud (MV). Las topologías obtenidas en ambos análisis fueron similares, por lo que el árbol que se presenta es el derivado de IB (Fig. 8). Los números sobre los nodos corresponden a los valores de probabilidad posteriori del análisis de IB, mientras que los que se encuentran por debajo de los nodos corresponden al valor de bootstrap en el análisis de MV. Se utilizó al átido *Halocaridina rubra* como grupo externo con número de acceso en Genbank EF173837.

En el árbol se pueden distinguir 6 clados principales, en la parte superior se encuentra un primer clado que corresponde a organismos de la especie *T. dzilamensis*; las secuencias con el nombre “*T. dzilamensis (Cervera)*” fueron obtenidas ejemplares recolectados en la localidad tipo (cenote Cervera en Yucatán). y de un organismo secuenciado por Jurado *et al.* (2017), el resto corresponden a organismos provenientes de los cenotes Odyssey, Bang y Tábano. Cabe mencionar que estos organismos fueron colectados por debajo y por encima de la haloclina.

En un segundo clado se agrupan tres individuos que corresponden a *Typhlatya* sp. 1 recolectados en el cenote Tábano por encima de la haloclina y también en este clado se agrupa una muestra de *T. mitchelli* obtenida por Jurado *et al.* (2017).

El tercer clado corresponde a la especie *T. campecheae*; proveniente del cenote Cantemo y es hermano de *T. pearsei*; dos organismos de esta especie se recolectaron en el cenote Odyssey por encima de la haloclina, dos secuencias de *T. pearsei* agrupadas en el clado provienen del GenBank y una más que proviene de un organismo depositado en la CNCR. El cuarto clado corresponde a *T. mitchelli* que proviene del SOBH cenote Odyssey en donde el único organismo se recolectó en la parte dulce de la haloclina.

En el quinto clado se agruparon los individuos de *Typhlatya* sp. 2, que son los individuos con un rostro acuminado hacia abajo en vista dorsal, los tres organismos se hallaron en el cenote Odyssey, uno por debajo y los otros dos por encima de la haloclina.

En el sexto clado se agruparon como especies hermanas; *T. iliffei* y *T. rogersi*, de isla Bermuda e isla Ascensión, respectivamente, ambas del océano Atlántico. Por último

está el grupo externo, *Halocaridina rubra* el cual es un árido que habita Hawái.

Es importante señalar que todas las especies mexicanas forman un grupo monofilético bien soportado (Probabilidad posteriori 1 en IB y Bootstrap en ML 90). El resto de los nodos también tienen una probabilidad posteriori de 1, lo que indican buen soporte. En el caso del análisis de Máxima Verosimilitud se desecharon los nodos con valores por debajo de 50% de Bootstrap (Figura 8).

Distancias genéticas

Con respecto a las especies mexicanas se obtuvieron las distancias genéticas en porcentaje entre las diferentes secuencias, así mismo se obtuvo el promedio de estas distancias (Tabla 6), se puede ver que las especies resultaron con más del 5% de distancia entre ellas. Las distancias menores se obtuvieron entre las especies *T. pearsei* y *T. campecheae* que arrojaron una distancia de 5.28%, mientras que la mayor distancia genética se dio entre *Typhlatya* sp. 1 y *T. campecheae* con una distancia de 18.98%.

Basados en los tiempos de calibración propuestos por Botello *et al.* (2012) en que compartieron ancestro *T. mitchelli* y *T. pearsei* se obtuvieron los tiempos de divergencia expresados en millones de años (Figura 9). Las especies mexicanas que compartieron ancestro común más recientemente de 1.1 millones de años (m.a.) aproximadamente son *T. pearsei* y *T. campecheae*. Las especies *T. mitchelli* y *T. pearsei* – *T. campecheae* compartieron un ancestro común hace unos 4.8 m.a. aproximadamente. *Typhlatya* sp. 2 divergió hace 10.39 millones de años. Por otro lado *T. dzilamensis* compartió ancestro común con *Typhlatya* sp. 1 hace 10.56 m.a. aproximadamente. El ancestro común de todas las especies mexicanas debió existir hace unos 14.86 m.a.

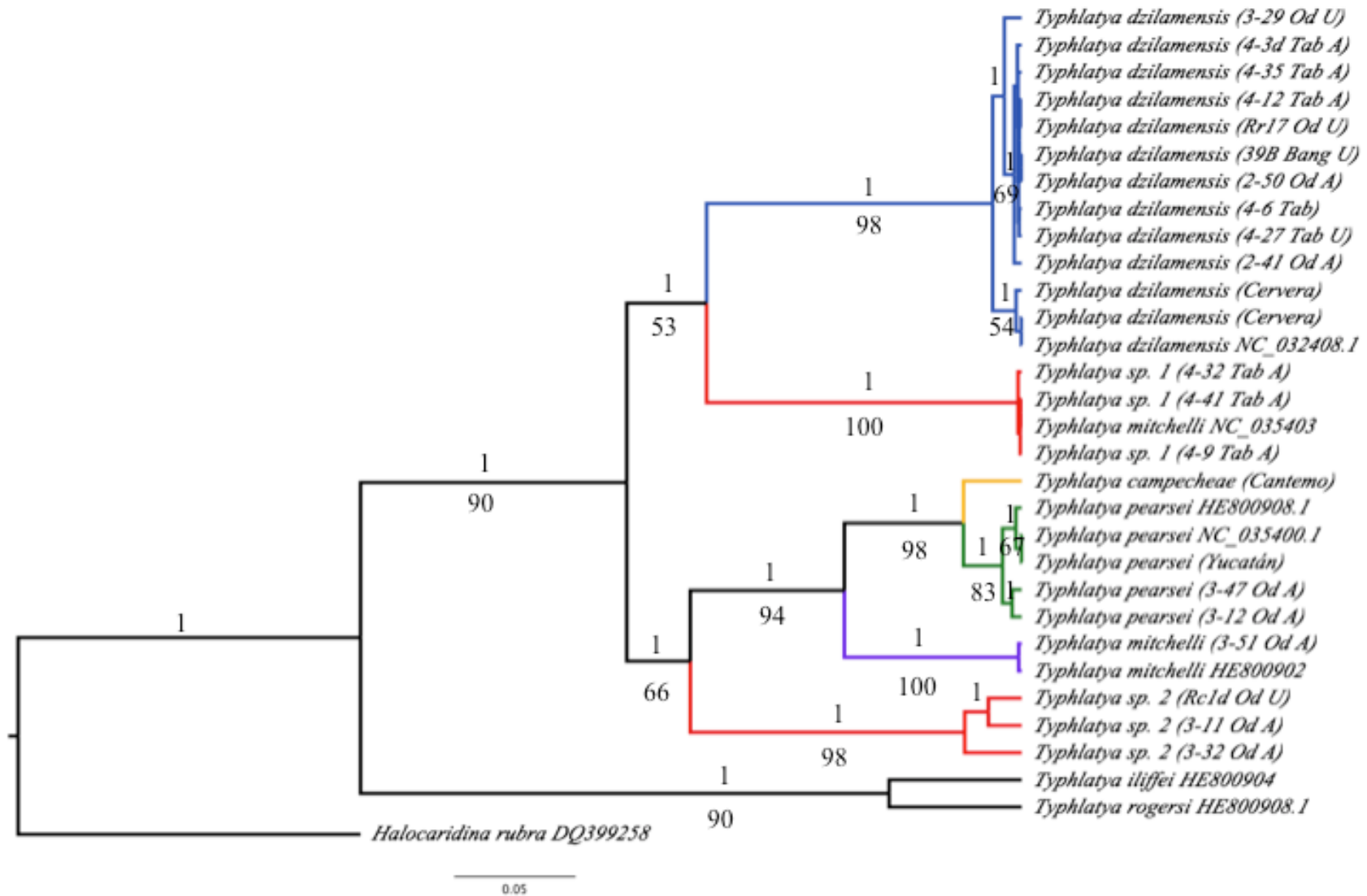


Figura 8. Hipótesis filogenética resultado del análisis Bayesiano del gen COI que presenta las relaciones de diferentes especies de *Typhlatya*, usando a *Halocaridina rubra* como grupo externo. Los números sobre cada nodo corresponden a la PP del análisis de IB; los valores por debajo de los nodos representan los valores de bootstrap del análisis de Máxima Verosimilitud. Solo se presentan valores mayores a 50 % de MV y 0.5 PP.

Tabla 6. Matriz de distancias genéticas “p” o no corregidas para el gen COI entre especies de *Typhlatya* de la península de Yucatán. Se presenta el promedio de las distancias; las distancias están dadas en porcentajes.

	Porcentaje de distancias									
	<i>T. dzilamensis</i>	<i>Typhlatya sp 1</i>	<i>T. mitchelli NC</i>	<i>T. mitchelli</i>	<i>T. pearsei</i>	<i>T. campecheae</i>	<i>Typhlatya sp 2</i>	<i>T. iliffei</i>	<i>T. rogersi</i>	<i>Halocaridina rubra</i>
<i>T. dzilamensis</i>	0.64									
<i>Typhlatya sp 1</i>	15.58	0.00								
<i>T. mitchelli NC</i>	16.67	0.00	0.00							
<i>T. mitchelli</i>	16.67	17.99	17.99	0.00						
<i>T. pearsei</i>	17.81	17.99	17.99	10.73	1.16					
<i>T. campecheae</i>	18.81	18.98	18.98	12.87	5.28	0.00				
<i>Typhlatya sp 2</i>	18.63	18.59	18.59	16.39	15.34	16.50	4.07			
<i>T. iliffei</i>	21.91	22.77	22.77	22.77	21.68	21.45	21.67	0.00		
<i>T. rogersi</i>	22.34	21.62	21.62	21.62	21.42	21.78	21.40	9.41	0.00	
<i>Halocaridina rubra</i>	22.25	20.96	20.96	23.10	22.38	21.78	22.28	22.28	21.29	0.00

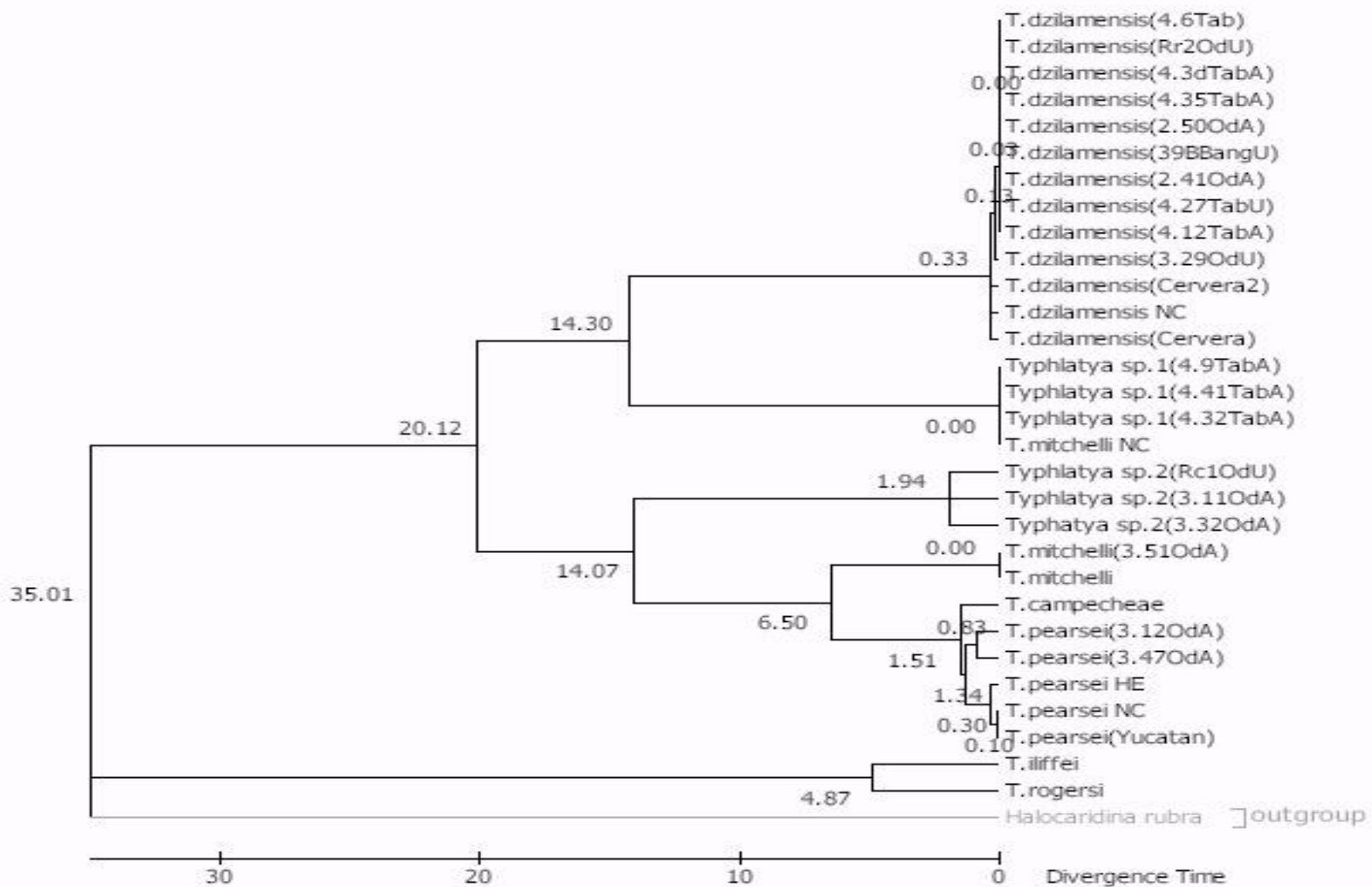


Figura 9. Tiempos de divergencia expresada en millones de años entre las especies de *Typhlatya*. Se presentan datos con una calibración de 6 – 7 millones millones en el nodo del ancestro común más reciente de *Typhlatya mitchelli* y *Typhlatya pearsei*.

DISCUSIÓN

Análisis morfológico

Las diferencias morfológicas entre las especies del genero *Typhlatya* son muy sutiles, principalmente se basan en la dirección de proyección y el tamaño del rostro, longitud total de los organismos, el tamaño de las pleuras, número de espinas en el telson y forma del caparazón. Debido a que los caracteres de dos morfotipos no correspondían a alguna especie descrita para la península de Yucatán se optó por revisar los caracteres moleculares. Por ejemplo, el tamaño del rostro se prolonga más allá del ojo pero no rebasa el primer artejo antenular; el rostro en dirección hacia abajo (cóncavo con respecto al ojo) que tampoco es un carácter de las especies ya descritas y talla pequeña en organismos adultos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se observa que la especie *Typhlatya* sp. 2 tienen cierta tolerancia a las concentraciones de sales que existen en las columnas de agua de los cenotes, ya que algunos individuos de dicha especie fueron recolectados por encima y por debajo de la haloclina. Lo mismo ocurre para la especie *T. dzilamensis*, los organismos recolectados para este estudio fueron hallados en ambas columnas de agua; anteriormente sólo se habían observado y recolectado en profundidades por debajo de la haloclina y se llegó a pensar que eran exclusivamente de agua marina. Este comportamiento adaptativo ya había sido reportado por Mejía *et al.* (2013) para *T. pearsei*, los autores indican que esta especie fue observada nadando con los pleópodos, tanto en la capa marina como en la capa dulce del cenote Crustacea. Además, algunos individuos se hallaron en las paredes, en el techo (por encima de la haloclina) e incluso descansando en el sedimento en la capa marina de dicho cenote (por debajo de la haloclina). De acuerdo a Hunter (2008) un tercio de las especies del género no habitan agua dulce; *T. dzilamensis*, *T. rogersi*, *T. kakuki*, *T. iliffei*, *T. garciai* y *T. galapagensis* son especies que habitan agua salobre e incluso agua totalmente salada. Cruz (2008) hace un análisis de densidades de la haloclina, así como la densidad de varias especies de *Typhlatya*, llegando a la conclusión de que la densidad de una *Typhlatya* es mayor a la del agua salada, por lo tanto la haloclina no es una barrera física para estos organismos. Además las capacidades de tolerancia y

osmorregulación que cualquier decápodo presenta, facilitan su movimiento de una columna de agua a la otra. No se descarta que las especies de *Typhlatya* tengan alguna preferencia de permanencia en cuanto a las concentraciones salinas de las columnas de agua, seguramente debido a sus adaptaciones fisiológicas, sin embargo, varios estudios demuestran que pueden nadar en cualquier columna de agua, y se piensa lo hacen principalmente para buscar alimento, lo anterior es probable que se aplique para todas las especies del género.

Antes de este trabajo, *T. dzilamensis* sólo se había recolectado dos veces por Álvarez *et al.* (2005, 2015) en ambas ocasiones al norte de la península de Yucatán, en la región de Dzilam de Bravo, se pensaba que se limitaba a esta región sin contacto con otras especies de *Typhlatya*. El análisis genético realizado en este trabajo, indica que también se distribuye en la región sureste de la península, en el estado de Quintana Roo, cohabitando con otras cuatro especies del género en el ramal norte del Sistema Ox Bel Ha. El dato anterior resulta interesante y de relevancia ya que expande el territorio de distribución de la especie y aporta argumentos para priorizar zonas de conservación en la península.

En relación a la problemática anterior de identificación de especies, las secuencias de ADN han dado a la taxonomía una herramienta capaz de detectar diferencias genéticas en ciertas especies que a menudo se clasifican erróneamente como la misma, por ser morfológicamente similares, en otras palabras: especies crípticas debido a que la especiación no siempre está acompañada por cambios morfológicos (Knowlton, 1986). Las especies crípticas, según Knowlton (1986), son aquellas que son difíciles de reconocer usando métodos sistemáticos tradicionales y pueden o no estar cercanamente emparentadas. Una vez que se ha resuelto con información bioquímica y se demuestre que las especies son estrechamente emparentadas se puede hablar de especies hermanas.

Bickford *et al.* (2006) mencionan que las especies crípticas son más comunes en aquellas especies en las que los sentidos químicos están altamente desarrollados que en aquellas en las que la visión está más desarrollada, porque los cambios en este tipo de comunicación no conllevan cambios morfológicos. Según Bickford *et al.* (2006) las especies crípticas son comunes en ambientes en los que los organismos han sacrificado la comunicación visual y han optado por diversas estrategias como el reconocimiento químico, debido al número limitado de formas en las cuales un organismo se puede adaptar

a esas condiciones. De acuerdo a lo propuesto por Bickford *et al.* (2006) Los ambientes anquihalinos son ideales para albergar especies crípticas, lo que hace plantearse la pregunta de si ¿Podría haber especies crípticas de *Typhlatya* en los sistemas anquihalinos? Si bien las cuatro especies de *Typhlatya* que se han descrito para México presentan diferencias morfológicas, estas son sutiles y en ocasiones sólo especialistas logran reconocerlas, sin embargo, las especies crípticas son indistinguibles morfológicamente y únicamente trabajos moleculares pueden revelar diferencias. Las especies que en este trabajo son nombradas *Typhlatya* sp. 1 y *Typhlatya* sp. 2 tienen diferencias morfológicas muy sutiles con respecto a otras especies mexicanas. En el caso de *Typhlatya* sp. 1 el rostro es similar al de *T. campecheae*, recto y pasando el margen de los ojos, los individuos miden aproximadamente 22 mm (Figs. 2a y 6a, b). Por otra parte, los individuos de *Typhlatya* sp. 2 presentan el rostro acuminado hacia abajo en vista dorsal y la longitud total es de 19 mm aproximadamente (Fig. 7).

El grupo mexicano es monofilético (Fig. 8). Por el tiempo en que compartieron el ancestro en común, hace más de 43 millones de años (m.a.), pudo haber habitado la región de Campeche ya que el resto de la península aún no emergía, se encontraba cubierta por aguas oceánicas, o bien otras zonas del mar Caribe o del Atlántico.

Las distancias sutiles que se perciben en el clado de *T. dzilamensis* se debe a variaciones poblacionales debido a que las secuencias pertenecen a dos regiones diferentes, SOBH y cenote Cervera, Yucatán. La distancia promedio de esta especie es de 0.64% (Fig. 8).

En el clado correspondiente a *T. mitchelli*, de los individuos que obtuvimos en el SOBH solamente se pudo secuenciar un organismo de esta especie y su morfología correspondía a la descrita por Hobbs y Hobbs. También se añadieron dos secuencias de *T. mitchelli* que se encuentran en GenBank, una del trabajo de Botello *et al.* (2012) y la otra de Jurado *et al.* (2017), sin embargo, hay una distancia entre ambas secuencias de 17.99% lo cual es un valor elevado si consideramos que pertenecen a la misma especie, y excede el 10% que Botello *et al.* (2012) mencionan suficiente para considerar especies distintas. En ambos análisis realizados para obtener los árboles *T. mitchelli* NC_035403 de Jurado *et al.* (2017) se agrupa con la especie que se nombra como *Typhlatya* sp. 1, mientras que *T.*

mitchelli de Botello *et al.* (2012) se agrupa con la especie encontrada en el SOBH que se identificó como *T. mitchelli*. Lo anterior indica que se debe hacer una revisión morfológica del individuo utilizado por Jurado *et al.* (2017) en su estudio para corroborar que su identificación sea correcta.

Webb (2003) menciona que en sus análisis hubo un $20.7\% \pm 0.3$ de distancias del gen COI entre *T. pearsei* y *T. mitchelli*, usando el modelo de Tamura Nei. Los resultados del presente estudio arrojaron un valor promedio de 10.7% con el parámetro de distancia p comparando estas mismas especies. Sin embargo, cuando se compara *T. campecheae* y *T. pearsei* las distancias son de 5.3%, valores relativamente bajos tomando en cuenta que Botello *et al.* (2012) encontraron que el mínimo para distinguir especies de *Typhlatya* es de 10%. Cabe mencionar que *T. campecheae* y *T. pearsei* varían morfológicamente; la forma del caparazón, el tamaño del rostro y el tamaño de la sexta pleura así como la longitud de los organismos (Figs. 2 b y c). Debido al restringido hábitat de *T. campecheae*, únicamente en dos cenotes de Campeche, se puede inferir que el ancestro común de estas dos especies se separó en dos poblaciones, transcurriendo el tiempo suficiente para divergir morfológicamente y genéticamente debido a diferentes condiciones ambientales o a causa de deriva génica. A pesar del bajo porcentaje en la distancia genética, se apoya la idea que *T. campecheae* y *T. pearsei* deben ser consideradas como especies distintas y no como especies sinónimas, ya que morfológicamente son diferentes y posiblemente ya han alcanzado un aislamiento reproductivo por los 1.51 millones de años en los que de acuerdo a este análisis pudieron haber divergido (Figura 9), sin embargo, Knowlton (1993), mencionan que para alcanzar un fuerte aislamiento reproductivo es necesario 3 – 3.5 millones de años. En base a las distancias generadas en este trabajo y observando las que resultaron de Botello *et al.* (2012) se propone una distancia por encima del 5% para distinguir especies del género *Typhlatya*.

El último clado de las especies mexicanas corresponde a *Typhlatya* sp. 2 con una distancia promedio de 4.07% (Tabla 6) lo cual es alta considerando que los organismos provienen del mismo cenote Odyssey, sin embargo, la distancia no rebasa el 5% propuesto en el presente trabajo para distinguir especies del género *Typhlatya*, Otras especies de *Typhlatya* contempladas en el trabajo de Botello *et al.* (2012) tienen distancias amplias, tal

es el caso de *T. galapagensis* con 8.01%, *T. consobrina* con 4.07% y *T. miravetensis* con un promedio de 2.5%, aunque para estas especies se muestrearon poblaciones distintas. El añadir más secuencias del morfotipo *Typhlatya* sp. 2 ayudará a tener un panorama más certero acerca de lo que está sucediendo con la especie o posibles especies y su variación genética así como su dinámica poblacional.

Análisis molecular

Con respecto a los análisis filogenéticos en *Typhlatya*, Webb (2003) realizó un estudio filogenético encontrando una secuencia que no correspondía a ninguna especie secuenciada previamente y que tenía altas divergencias interespecíficas con las otras dos especies de la península de Yucatán (*T. pearsei* y *T. mitchelli*), a esta especie la nombró como ESU (unidad evolutivamente significativa, por sus siglas en inglés). Debido a que en la tesis de Webb no se obtuvieron secuencias del gen COI para esa especie, únicamente del gen citocromo b y 16s, no fue posible hacer la comparación con las especies incluidas en el presente trabajo para conocer si algunas de estas especies corresponden a lo que Webb nombró como ESU.

En general los datos arrojados por el análisis de Botello *et al.* (2012) indican que el género *Typhlatya* es un grupo parafilético (Fig. 3), lo que significa que no tienen un ancestro en común, con base a la topología, las especies cuya posición no está resuelta son *T. galapagensis* y *T. monae*. Botello *et al.* (2012) indicaron que *T. galapagensis* debe ser re clasificada en el género *Antecaridina* debido a un fuerte apoyo estadístico en los análisis filogenéticos y a características morfológicas similares al género antes mencionado. Algo similar ocurre para la especie *T. monae* que de acuerdo a análisis de los mismos autores esta especie es un grupo hermano de *Typhlatya* y *Stygiocaris*, por lo tanto, no pertenece a ninguno de estos géneros, además de que *T. monae* es la única especie del género con el quinto pereiópodo unirrámeo lo que refuerza la teoría que su relación filogenética no es lo suficientemente cercana para considerarse dentro del género *Typhlatya*. Sans y Platvoet (1995) sugieren que el ancestro común del género fue dividido en tres grandes poblaciones: la de América Central, la Europea y la del Atlántico medio. Ya que las poblaciones de América Central se dividen a las poblaciones del Caribe y de la península de Yucatán, el

árbol que surge del presente trabajo comprende este último grupo de América Central a la que se refieren Sans y Platvoet (2005).

Tiempo de divergencia

Múltiples fases del desarrollo de las cuevas de Quintana Roo están asociadas a cambios en el nivel del mar debido a los periodos de glaciación – interglaciación, dichos periodos favorecieron el desarrollo de pasajes y alternativamente expusieron o sumergieron las cuevas de ciertas regiones. Los periodos de glaciación – interglaciación también favorecieron la colonización de las especies acuáticas estigobioticas de la península de Yucatán. En el caso de las especies de *Typhlatya* en México, Botello *et al.* (2012) estimó que su último ancestro en común existió hace 9.7 – 20.22 millones de años. Hunter *et al.* (2008) también mencionan que la divergencia de las tres especies mexicanas de *Typhlatya* que analizaron ocurrió hace 16.3 – 24.8 millones de años, a finales del Oligoceno y principios del Mioceno. Webb (2003) menciona que algunos estudios colocan el origen de los crustáceos estigobios continentales, como el género *Typhlatya*, mucho más antiguo de lo que se pensaba, durante el Cretácico – Paleógeno.

Las actuales cuevas de la península pertenecen a la formación Carillo Puerto, con 15 m de grosor y se han datado de principios del Mioceno (24 m.a.), su formación se debió principalmente a las transgresiones y regresiones marinas en dicho periodo, sin embargo, el ambiente de agua dulce en las cuevas se empezó a formar al finalizar el Plioceno (2.5 m.a.) (Vázquez-Domínguez y Arita, 2010; Quintana Roo Speleological Survey, 2017). Estos periodos de formación son muy recientes en comparación con las fechas estimadas para la divergencia de las especies en el área. De acuerdo a la explicación de Smart *et al.* (2006) acerca de la formación de los pasajes en la península de Yucatán es posible que existan galerías antiguas conectadas con las galerías actuales. Hunter *et al.* (2008) proponen una hipótesis acerca de que las especies de *Typhlatya* en la península pudieron habitar cavernas más profundas que las actuales e incluso hoy en día podrían ocuparlas como pasajes que comunican con diferentes cavernas, esto explicaría por qué el hábitat de algunas especies como *T. mitchelli*, *T. dzilamensis* y *T. pearsei* se encuentran en regiones tan distantes entre

sí. Webb (2003) analizó datos de tres genes para tres especies de *Typhlatya*, y mencionó que las poblaciones de *T. mitchelli* tienen una baja diferenciación genética a pesar de que dichas poblaciones están separadas por más de 200 km y su poca variabilidad tampoco corresponde con el tiempo geológico de formación de estas cuevas. Siguiendo con la idea de pasajes interconectados que aún no se conocen dentro de los sistemas, del 2003 al 2016 el sistema Ox Bel Ha pasó de tener una extensión de ≈ 100 km a 270.1 km y de 50 cenotes conocidos a 143, lo que significa que en 13 años se descubrió más del doble de kilómetros en pasajes. Por lo tanto, el flujo genético aún está presente entre poblaciones de *T. mitchelli* y algunas barreras geográficas no han impedido rupturas filogenéticas o bien no hay dichas barreras, por lo tanto existe una continuidad poblacional. En el supuesto de que no todos los sistemas estén conectados, otra explicación que podría dar luz a la interrogante de la baja diversidad genética en *T. mitchelli* de acuerdo al doctor Álvarez es que “en algunas épocas de lluvias atípicas los sistemas se desbordan, arrojando agua de los cenotes e inundando algunos centímetros la región superficial” dando una alternativa a los organismos para migrar de un cenote a otro (F. Álvarez, comunicación personal, mayo 2015).

Hunter *et al.* (2008) usaron tiempos de divergencia calibrados para el gen COI con la finalidad de estimar las edades de divergencia del género *Typhlatya*, ya que se han probado con otros decápodos y han sido de utilidad. Debido a que desgraciadamente no existe material fósil del género *Typhlatya* se debe recurrir a lo que se ha hecho con taxones emparentados. Estos tiempos estiman 1.4% a 2.3% de divergencia por millón de años, estos autores concluyen que *T. mitchelli* y *T. pearsei* divergieron hace menos de 7 m.a. y fue el tiempo estimado ocupado en el presente trabajo (Figura 9).

Las especies de *Typhlatya* de la península de Yucatán compartieron ancestro común y tienen tiempos de divergencia de 20.12 m.a. (Figura 9), según Heinicke *et al.* (2007) la época en que emergió parte de la península hace 23.03 – 33.9 (Oligoceno). Estos tiempos concuerdan con la glaciación de la Antártica que de acuerdo con Shackleton y Kennett (1975) ocurrió entre el Eoceno tardío y el Oligoceno temprano hace aproximadamente 33.9 millones de años, estos autores demuestran a partir de datos de isótopos de carbono y oxígeno de muestras de foraminíferos, que en dichas épocas hubo un descenso en la temperatura del mar y el nivel del mar descendió de forma abrupta. Otro periodo de

tiempos de divergencia es de 14.07 – 14.30 m.a. donde divergió el último ancestro común de las especies *Typhlatya* sp. 2 – *T. campecheae* – *T. pearsei* y el de *Typhlatya* sp. 1 – *T. dzilamensis* cuya época corresponde al Mioceno medio donde se formaron nuevamente capas de hielo en la Antártica, por lo tanto hubo una disminución en el nivel del mar (Shackleton y Kennett, 1975).

Botello *et al.* (2012) dataron el origen del género hace 21.88 – 40.43 millones de años, mientras que para el último ancestro en común de las especies de México debió existir hace 9.7 – 20.2 m.a. La teoría de Hart *et al.* (1985), la más aceptada, es que el origen del género *Typhlatya* proviene de algún ancestro marino, sin embargo, una teoría alternativa propuesta por Hunter *et al.* (2008) menciona que el ancestro era un organismo diádromo que podía migrar sin problema hacia aguas dulces o saladas. Ninguna de estas dos teorías serían opuestas a que hace 20.12 m.a., que es el tiempo estimado que se obtuvo en el presente análisis para el ancestro común de las especies de *Typhlatya* de la península de Yucatán. El ancestro en común ya habría estado habitando la región, aunque esta región permaneciera sumergida por agua marina en ciertos periodos. Smart *et al.* (2006) sugieren que debido a los cambios en el nivel del mar pudieron formarse “paleocuevas” que se encuentran justo debajo de las actuales, en estas paleocuevas se pudieron refugiar los organismos anquihalinos cada que había un descenso en el nivel del mar.

Finalmente se puede mencionar que el género *Typhlatya* es un grupo de gran interés debido a su particular distribución dentro de sistemas anquihalinos en diversas regiones del mundo; aspectos basados en su biología y fisiología nos dan una idea de cómo pudo haber sido la colonización de estos ambientes por parte de este grupo de crustáceos. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos brindan cierta evidencia acerca de la diversidad del grupo, que como pudo observarse, es mayor a la que se tenía reportada hasta el momento.

CONCLUSIONES

- Se identificaron dos nuevos morfotipos denominados *Typhlatya* sp. 1 y *Typhlatya* sp. 2 cuyas diferencias morfológicas y genéticas sugieren que la diversidad del género es mayor a la que se tenía reportada.
- La topología de los análisis de IB y ML de las especies mexicanas muestra que son un grupo monofilético.
- Como mínimo hay cinco especies de *Typhlatya* habitando el sistema Ox Bel Ha, que se diferencian genética y morfológicamente y seis especies en total en la península de Yucatán.
- Los pasajes subterráneos y el incremento de su extensión a través del tiempo en cada sistema, así como distintos fenómenos climáticos han servido para la dispersión de especies en la península de Yucatán.
- Este estudio mostró que el cenote Odyssey tiene mayor diversidad con tres especies de *Typhlatya*.
- A pesar que *T. dzilamensis* sólo se había encontrado en ciertos cenotes de Yucatán, estos análisis indican que su hábitat es más amplio del que se pensaba.
- El solapamiento en el hábitat de las especies actuales seguramente se debió a contactos secundarios de poblaciones que habían sido separadas por diferentes eventos hace millones de años.
- La haloclina no es una barrera física para las especies de *Typhlatya*, sin embargo, cada especie tiene preferencia por cierto intervalo de salinidad.
- La historia natural del género es compleja, sin embargo, ha sido influida por diversos factores geológicos.
- El ancestro común de las especies mexicanas vivió hace 20.12 m.a. en el Mioceno.
- Debido a la importancia geológica y biológica de este ecosistema son necesarias medidas de protección del ecosistema más estrictas con la finalidad de preservar la región.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, F. y T.M. Iliffe. 2008. Fauna anquihalina de Yucatán. En: F. Álvarez y G. Rodríguez-Almaraz (eds.). *Crustáceos de México: estado actual de su conocimiento*. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp. 522
- Álvarez, F., E. Escobar y J. Alcocer. 2000. Sistemas anquihalinos en México. *Ciencia y desarrollo* 155: 36-45.
- Álvarez, F., T.M. Iliffe y J.L. Villalobos. 2005. New species of the genus *Typhlatya* (Decapoda: Atyidae) from anchialine caves in Mexico, the Bahamas, and Honduras. *Journal of Crustacean Biology* 25 (1): 81-94.
- Álvarez, F., T.M. Iliffe, L.S. Benítez, D. Brankovits y J.L. Villalobos. 2015. New records of anchialine fauna from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Check List* 11(1).
- Barr, T.C. y J.R. Holsinger. 2014. Speciation in Cave Faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16 (1985): 313-337.
- Benítez, L.S. 2014. Variación en la estructura y composición de la fauna anquihalina del sistema Ox Bel Ha (península de Yucatán) a través de un gradiente de distancia desde la zona litoral. Tesis de maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 1-10.
- Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193.
- Bickford, D., D. Lohman, S.N. Sodhi, K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. Ingram y I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (3): 148-155.
- Bishop, R.E. y T. Iliffe. 2012. Ecological physiology of the anchialine shrimp *Barbouria cubensis*: a comparison of epigeal and hypogean populations. *Marine Biodiversity* 42: 303-310.

- Bishop, R.E., B. Kakuk y J.J. Torres. 2004. Life in the hypoxic and anoxic zones: Metabolism and proximate composition of caribbean troglobitic crustaceans with observation on the water chemistry of two anchialine caves. *Journal of Crustacean Biology* 24 (3): 379-392.
- Bishop, R.E., W.F. Humphreys, N. Cukrov, V. Žic, G.A. Boxshall, M. Cukrov, T.M. Iliffe, F. Kršinić, W.S. Moore, J.W. Pohlman y B. Sket. 2015. 'Anchialine' redefined as a subterranean estuary in a crevicular or cavernous geological setting. *Journal of Crustacean Biology* 35 (4): 511-514.
- Botello, A. 2008. Estudios de variación genética en crustáceos de México. En: F. Álvarez y G. Rodríguez-Almaraz (eds.). *Crustáceos de México: estado actual de su conocimiento*. Universidad Autónoma de Nuevo León. 522 p.
- Botello, A., T.M. Iliffe, F. Álvarez, C. Juan, J. Pons y D. Jaume. 2012. Historical biogeography and phylogeny of *Typhlatya* cave shrimps (Decapoda: Atyidae) based on mitochondrial and nuclear data. *Journal of Biogeography* 40: 594-607.
- Chávez, E. 2015. Aspectos ecológicos y etológicos de decápodos estigobios (*Creaseria morleyi* y *Typhlatya* spp.) en cenotes de Yucatán: utilización espacio-temporal, cambios anuales y relaciones interespecíficas. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 78 p.
- Cruz, Y. 2008. Dieta y adaptaciones de la especie *Typhlatya mitchelli* de los sistemas anquihalinos de la península de Yucatán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 62 p.
- Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007. Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto de Ecología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 592 p.
- Escobar, E., L. Oseguera, G. Vázquez y A. Alcocer. 2002. The external micro-

anatomy of the cephalon of the asellotan isopod *Creaseriella anops*. *Hydrobiologia* 467: 57-62.

Hart, C.W., R.B. Manning y T.M. Iliffe. 1985. The fauna of Atlantic marine caves, evidence of dispersal by sea floor spreading while maintaining ties to deep waters. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 98: 288-292.

Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball y J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 312-321.

Heinicke, M.P., W.E. Duellman y H.S. Blair. 2007. Major Caribbean and Central American Frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *PNAS* 104: 10092-10097.

Hobbs, H.H. III y Jr. H.H. Hobbs. 1976. On the troglobitic shrimps of the Yucatan Peninsula, Mexico (Decapoda: Atyidae and Palaemonidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 240: 1-23.

Hunter, L.R., M.S. Webb, T.M. Iliffe y J. Alvarado. 2008. Phylogeny and historical biogeography of the cave-adapted shrimp genus *Typhlatya* (Atyidae) in the Caribbean Sea and western Atlantic. *Journal of Biogeography* 35: 65-75.

Iliffe, T.M. y R.E. Bishop. 2007. Adaptations to life in marine caves. Fisheries and Aquaculture. En: Patrick Safran (ed.). *Encyclopedia of Life Support Systems* pp. 1-26.

Iliffe, T.M. 1993. Fauna troglobia acuática de la península de Yucatán. En: S. I. Salazar-Vallejo y N. E. Gonzalez (eds.). Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México 2: 197-215.

Iliffe, T.M. 2012. Diving investigations of Bermuda's deep water caves. *Natura Croatica* 21: 64-69.

Iliffe, T.M. y L.S. Kornicker. 2009. Worldwide diving discoveries of living fossil

animals from the depths of anchialine and marine caves. *Smithsonian Contributions to Marine Science* 38: 269–280.

Jurado-Rivera, J.A., J. Ponce, F. Alvarez, A. Botello, William F. Humphreys, T. J. Page, T. M. Iliife, E. Willassen, K. Meland, C. Juan y D. Jaume. 2017. Phylogenetic evidence that both ancient vicariance and dispersal have contributed to the biogeographic patterns of anchialine cave shrimps. *Scientific reports* 7: 2852.

Knowlton, N. 1986. Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. *Journal of Crustacean Biology* 6: 356-363.

Knowlton, N. y L.A. Weigt. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *The Royal Society* 265: 2257-2263.

Knowlton, N., L.A. Weigt, L.A. Solorzano, D.K. Mills y E. Bermingham. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260: 1629–1632.

Kumar, S., G. Stecher y K. Tamura. 2015. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.

Mejía-Ortíz, L.M. y R.G. Hartnoll. 2006. A new use for useless eyes in cave crustaceans. *Crustaceana* 79 (5): 593-600.

Mejía-Ortíz, L.M., M.M. López, J. Pakes, G. Hartnoll y G.E. Zarza. 2013. Morphological adaptations to anchialine environments in species of five shrimp families (*Barbouria Yanezi*, *Agostocaris bozanici*, *Procaris mexicana*, *Callismata nohochi* and *Typhlatya pearsei*). *Crustaceana* 86 (5) 578-593.

Neisch, J.A., J.W. Pohlman y T.M. Iliife. 2012. The use of stable and radiocarbon isotopes as a method for delineating sources of organic material in anchialine systems. *Natura Croatica* 21: 83-85.

Ordóñez, C.I. y R.M. García. 2010. Formas kársticas comunes de los cenotes del

estado de Quintana Roo (México). M+A. Revista electrónica de Medioambiente, Norteamérica.

Page, T.J., W.F. Humphreys y J.M. Hughes. 2008. Shrimps down under: Evolutionary relationships of subterranean crustaceans from western Australia (Decapoda: atyidae: Stygiocaris). *PLoS ONE* 3: 1618.

Poholman, J.W., T.M. Iliffe y L.A. Cifuentes. 1997. A stable isotope study of organic cycling and the ecology of an anchialine cave ecosystem. *Marine Ecology Progress Series* 155: 17-27.

Quintana Roo Speleological Survey <https://caves.org/project/qrss/qrss.htm>

Ronquist, F. y J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572-1574.

Santos, S.R. 2006. Patterns of genetic connectivity among anchialine habitats: a case study of the endemic Hawaiian shrimp *Halocaridina rubra* on the island of Hawaii. *Molecular Ecology* 15: 2699- 2718.

Sans, S. y D. Platvoet. 1995. New perspectives on the evolution of the genus *Typhlatya* (Crustacea, Decapoda): First record of a cavernicolous atyd in the Iberian Peninsula, *Typhlatya miravetensis* n. sp. *Contributions to Zoology* 65(2): 79-99.

Shackleton, N.J. y J.P. Kennett. 1975. Paleotemperature history of the Cenozoic and the initiation of Antarctic glaciation: oxygen and carbon isotope analyses in DSDP Sites 277, 279, and 281. *Initial reports of the deep sea drilling project* 29: 743-755.

Smart, P.L., P.A. Beddows, J. Coke, S. Doerr, S. Smith y F.F. Whitaker. 2006. Cave development on the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Quintana Roo, Mexico. En Harmon, R.S., y Wicks, C., (eds). Perspectives on karst geomorphology, hydrology and geochemistry. *Geological Society of America*, Special paper 404: 105-128.

- Solís, F. y A. Laguarda. 2010. A new species of starfish (Echinodermata: Asteroidea) from an anchialine cave in the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 663-668.
- Stamatakis, A. 2014. RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30: 1312-1313.
- Texas A&M University at Galveston <http://www.tamug.edu/cavebiology/>
- Torres, E. 2009. Variación Genética en *Procambarus* (Austrocambarus) *llamasi* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) de la península de Yucatán, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 46 p.
- Torres, O., J. Alcocer, P. Beddows, E. Escobar y A. Lugo. 2011. The key role of the chemolimnion in meromictic cenotes of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Hydrobiologia* 677: 107-127 DOI 10.1007/s10750-011-0746-9.
- Vázquez-Domínguez, E. y H.T. Arita. 2010. The Yucatan peninsula: biogeographical history 65 million years in the making. *Ecography* 33: 212-219.
- Webb, M.S. 2003. Intraspecific relationships among the stygobitic shrimp, *Typhlatya mitchelli*, by analyzing sequence data from mitochondrial DNA. MSc thesis, Texas A&M University, College Station, TX, USA.