



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Discriminación morfológica, molecular y determinación de la variación genética de peces blancos (Atherinopsidae: *Chirostoma*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Hidrob. Mónica Yanelli Pérez Ramírez

Directora: Dra. Irene de los Angeles Barriga Sosa

Asesores: Dr. Francisco F. Pedroche

Dr. Francisco García de León

Sinodales: Dr. Francisco J. Fernández Perrino

M. en C. Patricia M. Rojas Carrillo

México, D.F., Diciembre de 2005



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00018

DISCRIMINACION MORFOLOGICA,
MOLECULAR Y DETERMINACION DE
LA VARIACION GENETICA DE
PECES BLANCOS
(Atherinopsidae: Chirostoma)

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 9 del mes de diciembre del año 2005 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE
- DR. IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA
- M. EN C. PATRICIA MARGARITA ROJAS CARRILLO
- DR. FRANCISCO JAVIER GARCIA DE LEON
- DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA
DE: MONICA YANELLI PEREZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

Casa abierta al tiempo

Monica Yanelli Perez Ramirez
MONICA YANELLI PEREZ RAMIREZ
FIRMA DE LA ALUMNA

REVISÓ

Carmen Llorens Fabregat
LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

Oscar Armando Monroy Hermosillo
DR. OSCAR ARMANDO MONROY
HERMOSILLO

PRESIDENTE

Jose Francisco Flores Pedroche
DR. JOSE FRANCISCO FLORES
PEDROCHE

VOCAL

Irene de los Angeles Barriga Sosa
DR. IRENE DE LOS ANGELES
BARRIGA SOSA

VOCAL

Patricia Margarita Rojas Carrillo
M. EN C. PATRICIA MARGARITA
ROJAS CARRILLO

VOCAL

Francisco Javier Garcia de Leon
DR. FRANCISCO JAVIER GARCIA DE
LEON

SECRETARIO

Francisco Jose Fernandez Perrino
DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ
PERRINO

“La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Postgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)”

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola del Departamento de Hidrobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

La alumna recibió beca CONACyT registro: 180811 durante el período 2003-2005.

Además, el presente trabajo estuvo integrado en el proyecto CONACyT SAGARPA-2002-01 titulado: **Desarrollo de las bases técnicas y científicas para el cultivo del pescado blanco de Chapala (*Chirostoma promelas*) y Pátzcuaro (*C. estor*).**

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó



Mónica Yanelli Pérez Ramírez

El día 9 de diciembre del año 2005

Comité Tutorial

Directora: Dra. Irene de los Angeles Barriga Sosa

Asesor: Dr. José Francisco Flores Pedroche

Asesor: Dr. Francisco Javier García de León

Sinodal: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Sinodal: M. en C. Patricia M. Rojas Carrillo

DEDICADO A

Mis padres Elvia Ramírez y Gonzalo Pérez Cárdenas
y a mis hermanos Guillermo, Fernando, Verónica, Antonio y Guadalupe
por la confianza, el respeto y apoyo recibidos
Mis sobrinos Guillermo, Paulina, Andrea, Brenda, Rebeca, Moisés y Angel
por compartir tantas alegrías
Mis amigos de siempre con quienes la vida seguirá siendo una aventura
Todas las personas que participaron en la realización de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

A mi Comité Tutorial

por permanecer desde el inicio hasta el final

Dra. Irene de los Angeles Barriga Sosa:

por sugerir y permitir el desarrollo de esta tesis

Dr. Francisco F. Pedroche:

por sus atinados consejos y por motivarme en la realización

de este y cualquier otro proyecto

Dr. Francisco García de León:

por su apoyo incondicional, por confiar en mí y hacer crecer mi carácter

Dr. Francisco Fernández Perrino:

por la minuciosa revisión y tantas atenciones. Agradezco

los comentarios tan elogiosos

M. en C. Patricia M. Rojas Carrillo:

por el interés en el presente trabajo y sus amables recomendaciones

A mis compañeros de laboratorio

por el apoyo y los momentos que hicieron felices mi estancia

A mis profesores, compañeros y amigos de la UAM

por intervenir de tantas maneras en mi formación personal y profesional

INDICE GENERAL

Justificación	1
Introducción	3
Objetivos	4
Area de estudio	5
Marco Teórico	
El género <i>Chirostoma</i>	
Hipótesis acerca del origen de los Aterinópsidos	7
Ubicación taxonómica	9
Características relevantes de las especies	11
Caracteres morfológicos	
Descripción y aplicaciones	15
Técnicas morfológicas	16
Marcadores genéticos	
Descripción y aplicaciones	17
Técnicas moleculares	20
Capítulo I. Discriminación morfológica	
Antecedentes	23
Metodología	25
Resultados	27
Discusión	30

Capítulo II. Discriminación molecular	
Antecedentes	34
Metodología	35
Resultados	40
Discusión	46
Capítulo III. Variación genética	
Antecedentes	49
Metodología	51
Resultados	55
Discusión	59
Conclusiones y Recomendaciones	64
Referencias	67
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	
Ubicación geográfica de los lagos de Chapala y Pátzcuaro.	6
Figura 2.	
Estructura y sitios de variación de la región control del ADN mitocondrial en peces.	19
Figura 3.	
Caracteres morfológicos analizados en <i>Chirostoma</i> .	26
Figura 4.	
ADN total de los organismos provenientes del Centro Acuícola Tizapán.	40
Figura 5.	
Amplificacbnnes del gen mitocondrial para el ARN r16S.	41
Figura 6.	
Amplificaciones control.	41
Figura 7.	
Productos de PCR purificados del gen mitocondrial para el ARN r16S.	42
Figura 8.	
Amplificaciones de la región control mitocondrial.	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	
Procedencia de las poblaciones analizadas.	25
Tabla 2.	
Intervalos y promedios de caracteres morfológicos diagnóstico en especies de peces blancos del género <i>Chirostoma</i> de acuerdo con Barbour (1973 b).	28
Tabla 3.	
Valores de los caracteres morfológicos analizados en las tres poblaciones de estudio.	29
Tabla 4.	
Intervalos de algunas variables morfológicas descritas para poblaciones de <i>Chirostoma lucius</i> .	32
Tabla 5.	
Tamaños y número de fragmentos teóricos obtenidos a partir de simulaciones al usar siete enzimas de restricción en secuencias (560-570 pb) de cada una de las especies de peces blancos.	39
Tabla 6.	
Haplotipos compuestos esperados y observados para los individuos de la población Pátzcuaro.	43
Tabla 7.	
Haplotipos compuestos esperados y observados para la población de Chapala.	44

Tabla 8.	
Haplotipos compuestos esperados y observados para la población de Tizapán.	45
Tabla 9.	
Procedencia de organismos analizados molecularmente (género <i>Chirostoma</i>).	51
Tabla 10.	
Relación de procedencia de los organismos analizados del género <i>Poblana</i> .	52
Tabla 11.	
Intervalos de concentración y calidad de los productos purificados.	56
Tabla 12.	
Índices de diversidad genética en los peces blancos objeto de estudio.	57
Tabla 13.	
Análisis de varianza molecular (AMOVA) de <i>Chirostoma</i> y <i>Poblana</i> .	58
Tabla 14.	
Análisis de varianza molecular (AMOVA) de las especies de <i>Chirostoma</i> .	59

RESUMEN

Las especies de peces blancos (*Chirostoma estor*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* y *C. sphyraena*) constituyen un recurso de importancia económica y cultural en la Mesa Central de México. En los últimos años, las poblaciones nativas han disminuido debido a la sobreexplotación pesquera, la introducción de especies y el deterioro ambiental. En este trabajo se aborda la discriminación de especies y la determinación de la variación genética con la finalidad de proveer información aplicable en manejo acuícola, ya sea con fines de repoblamiento o producción. Se utilizaron 11 caracteres morfológicos (5 morfométricos y 6 merísticos) y haplotipos compuestos del gen mitocondrial para el ARN ribosomal 16S para efectuar la discriminación de especies. Tres poblaciones fueron analizadas: dos silvestres (Chapala y Pátzcuaro) y una cultivada. Los 28 organismos analizados presentaron el morfotipo de los peces blancos, no pudiéndose discriminar a nivel de especie debido a: el alto traslape de caracteres morfológicos entre especies y debilidades en el análisis morfológico. El análisis de fragmentos de restricción del gen mitocondrial para el ARN ribosomal 16S reveló haplotipos compuestos esperados para las especies *C. sphyraena* (población Chapala) y *C. estor* (población Pátzcuaro). La población cultivada (*Chirostoma* sp.) no pudo ser discriminada puesto que presentó un patrón de haplotipos compuestos complejo de discernir debido quizá a la variación genética intra específica y/o la baja resolución del método. La probabilidad de hibridación entre especies congéneres y el manejo inadecuado que ha tenido el recurso, derivan en las limitaciones de ambos análisis. Por medio del análisis de secuencias de la región control mitocondrial ($n= 46$) se determinó y comparó la variación genética (a partir de la estimación de la diversidad nucleotídica) en las especies de *Chirostoma* (0.38) y en el género *Poblana* (0.35). En *Chirostoma*, se determinó la variación genética inter específica *C. estor* (0.28), *C. humboldtianum* (0.28) y *C. sp.* (0.46) e intra específica en *C. estor* silvestre (0.39) y cultivada (0.16). El análisis de estructura genética sugiere diferenciación entre *Chirostoma* sp. y *Poblana* sp. ($F_{CT}= 0.95$; $P? 0.000$) así como entre las especies de *Chirostoma* analizadas ($F_{ST}= 0.22$; $P? 0.000$).

ABSTRACT

The "peces blancos" (*Chirostoma estor*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* and *C. sphyraena*) are species of great economical and cultural interest in Mexico's Mesa Central. Their actual wild populations had dramatically decreased mainly because of the introduction of other species, the detrimental environmental conditions and high fishing pressure. This thesis provides information regarding species discrimination and genetic variation with the aim to generate information applicable to the management, re-stocking and production of these important fish species. Eleven morphological characters (five morphometric and six meristic) and composite haplotypes of the mitochondrial ribosomal 16S gene (mt r16S) utilising six restriction enzymes were utilised to discriminate among species. Three populations were studied: two wild (Chapala and Patzcuaro) and one cultivated. All organisms analysed had the "pescados blancos" morphotypes, however their identification to the species level was not possible to elucidate because of the overlap in morphological features. PCR-RFLP analysis ($n= 28$) utilizing the restriction enzymes *Aci* I, *Bce* AI, *Bfa* I, *Bsa* AI, *Eag* I and *Hpy*CH4 IV discriminate *Chirostoma sphyraena* (Chapala) and *C. estor* (Patzcuaro). Cultivated *Chirostoma* could not be discriminated to the species level due to 1) a possible genetic variation and 2) to a low resolution of the method used. Putative hybridization events among species as well as inadequate management practices limit the identification methods. The analysis of ~ 300 nucleotides of the mitochondrial control region ($n= 46$) indicates levels of variation that goes from 0.35 to 0.38 in *Poblana* sp. and *Chirostoma* sp., respectively. Sequence variation was found both between (0.28 for *C. estor* and *C. humboldtianum*, and 0.46 in *C. sp*) and within species of *Chirostoma* (0.39 and 0.16 for wild and cultivated samples). The *F*-test indicated significant genetic differentiation among *Chirostoma* sp. and *Poblana* sp. ($F_{CT}= 0.95$; $P? 0.000$) and among the species of "peces blancos" ($F_{ST}= 0.22$; $P? 0.000$).

SOMMARIO

I pesci bianchi (*Chirostoma estor*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* e *C. sphyraena*) sono una risorsa di grande importanza economica e culturale. Il deterioramento ambientale, il grande sfruttamento e l'introduzione di altre specie, hanno provocato la diminuzione delle popolazioni locali. In questo lavoro si affrontano la discriminazione delle specie e la variazione genetica con la finalità d'assegnare informazione applicabile a la coltura per conservazione o produzione. Si utilizzano cinque variabile morfometrica e sei meristiche anche *haplotipi* composti del gen mitocondriale per ARN r16S per discriminare le specie. Tre popolazione furono analizzate: due selvatiche (Chapala e Patzcuaro) ed'una coltura. I 28 organismi analizzati presentarono il *morfotipo* dei pesci bianchi anche non si discriminarono come specie per la somiglianza di caratteri morfologici e la limitazione nell'analisi morfologico. I frammenti di restrizione del gen mitocondriale r16S ha svelato *haplotipi* composti sperati per le specie *Chirostoma sphyraena* (Chapala) e *C. estor* (Patzcuaro). La popolazione in coltura (*Chirostoma* sp.) non fu discriminata al presentare un modello difficile per discernire. La possibilità d'ibridazione fra queste specie e il controllo inadeguato sono limitazione entrambi analisi. Per mezzo della regione controllo mitocondriale ($n= 46$) fu determinata la variazione genetica (estimando la diversità nucleotidica) in specie di *Chirostoma* (0.38) e *Poblana* sp. (0.35). Fra le specie *C. estor* (0.28), *C. humboldtianum* (0.28) e *C. sp.* (0.46) e dentro di *C. estor* selvatica (0.39) e in coltura (0.16). L'analisi di struttura genetica suggerisce differenziazione fra *Chirostoma* e *Poblana* ($F_{CT}= 0.95$; $P? 0.000$) non appena fra le specie di *Chirostoma* ($F_{ST}= 0.22$; $P? 0.000$).

I. JUSTIFICACION

El género *Chirostoma* (Pisces:Atherinopsidae), representado por los peces blancos y los charales, es endémico de la Mesa Central de México. Estos peces se distribuyen en los lagos de Chapala y Pátzcuaro principalmente, siendo un recurso de gran importancia económica, alimenticia y cultural para un gran número de familias en la región. Dentro de los peces blancos (*Chirostoma estor* Jordan, 1879, *C. promelas* Jordan y Snyder, 1899, *C. lucius* Boulenger, 1900, *C. sphyraena* Boulenger, 1900 y *C. humboldtianum* Valenciennes, 1835), las especies *C. promelas* del lago Chapala, así como *C. estor* y *C. humboldtianum* del lago Pátzcuaro, se encuentran bajo sobreexplotación pesquera y sufriendo los efectos del deterioro ambiental como resultado de la actividad humana, lo cual aunado a la introducción y trasplante de especies ha provocado la disminución de su densidad poblacional. Actualmente, de las especies de peces blancos, sólo *C. promelas* se menciona en la NOM-059-SEMARNAT -2001, norma que incluye el listado oficial de especies en riesgo en México.

Una de las grandes dificultades existentes para el manejo y conservación de estas especies es su discriminación (identificación), la cual resulta problemática por los métodos taxonómicos tradicionales hasta ahora empleados, debido a la gran similitud de caracteres morfológicos entre especies. Por lo anterior, en los últimos años, en la Planta Experimental de Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa se han venido empleando marcadores y técnicas moleculares con la finalidad de establecer métodos más precisos para la discriminación, los cuales en la práctica pueden ser no invasivos y aplicables en cualquier estadio de vida de los organismos.

En éste trabajo se determinaron patrones especie-específicos de restricción enzimática (haplotipos) del gen mitocondrial para el ARN ribosomal (r) 16S de peces blancos, basándose en lo propuesto por Barriga-Sosa *et al* (2005), con la finalidad de discriminar a nivel de especie a organismos silvestres y cultivados provenientes de los lagos de Chapala y de Pátzcuaro. Además, se analizaron secuencias (301 nucleótidos) de la región control del genoma mitocondrial para estudiar la variación genética, la cual se relaciona con la capacidad de respuesta de los organismos a cambios ambientales. Dicha variación se determinó inter específicamente en los organismos discriminados como *Chirostoma sp.*, *C. estor* y *C.*

humboldtianum (la última especie fue discriminada molecularmente por Pérez-Ramírez, 2003), así como intra específicamente en poblaciones silvestres y cultivadas de *C. estor*. También se determinó la variación genética en *Poblana* sp. (Atherinopsidae). La importancia de éste estudio radica en la validación del método de discriminación de especies de peces blancos tradicional (Barbour 1973 a) y el propuesto por Barriga-Sosa *et al.* (2005) y, por otro lado, en presentar datos sobre la variación de la región control mitocondrial para las especies antes mencionadas, datos que serán de valiosa ayuda en el conocimiento del acervo genético de poblaciones silvestres sometidas a manejo y/o explotación. Por lo anterior, la Tesis se encuentra estructurada en tres capítulos que abordan los principales tópicos: la discriminación morfológica, la discriminación molecular y la variación genética.

II. INTRODUCCION

El género *Chirostoma* es uno de los elementos ictiofaunísticos representativos del Altiplano Mexicano y, de acuerdo con Barbour (1973 *a* y *b*), está conformado por 18 especies y 6 subespecies, integradas en dos grupos: Jordani y Arge.

Dentro del grupo Jordani se encuentran los peces blancos (*Chirostoma estor*, *C. promelas*, *C. lucius*, *C. sphyraena* y *C. humboldtianum*), los cuales constituyen un recurso de gran importancia para diversas etnias de la Mesa Central del país, considerándose como una de las pesquerías más antiguas y de mayor tradición (Soria-Barreto *et al.*, 1998; Paulo-Maya *et al.*, 2000).

Los lagos de Chapala y Pátzcuaro presentan el mayor número de especies del género con relación a otros embalses de la región así como problemáticas similares: introducción de especies de otros embalses y sobreexplotación pesquera, así como deterioro ambiental producto de la actividad humana, lo cual ha repercutido directamente sobre las poblaciones de especies locales a través del tiempo (Chacón Torres *et al.*, 1991; Berlanga-Robles *et al.*, 1997; 2002), provocando la disminución de éstas e incluso la posible subdivisión intra-lacustre de poblaciones, como ocurre con *Chirostoma grandocule* en Pátzcuaro (Barriga-Sosa *et al.*, 2004).

III. OBJETIVOS

General

Discriminar a especies de peces blancos y determinar la variación genética de poblaciones de los lagos de Chapala y Pátzcuaro.

Específicos

1. Seleccionar morfotipos por medio de caracteres merísticos y morfométricos.
2. Obtener y analizar los patrones generados por restricción enzimática del gen mitocondrial para el ARN ribosomal *16S* en las especies de peces blancos.
3. Analizar secuencias de la región control mitocondrial y determinar la variación genética intra e inter específica.
4. Comparar la variación genética en *Chirostoma* y *Poblana* así como en poblaciones silvestres y cultivadas de *Chirostoma*.

IV. AREA DE ESTUDIO

Lago de Chapala

Localizado en los 20°07'-20°21' N y los 102°40'-103°25' O (Guzmán Arroyo y Merino Nambo, 1995), es el lago más grande de nuestro país (Figura 1). Se ubica en los estados de Jalisco y Michoacán, con una extensión aproximada de 75x25 Km y 1520 msnm (Filonov, 2002). Su origen geológico no es del todo conocido, aunque se postula que ocurrió en el Plioceno tardío (hace 3 millones de años), por lo que sería uno de los lagos más antiguos de Norteamérica.

Este embalse juega un papel fundamental en la economía de millones de personas (Guzmán Arroyo y Merino Nambo, 1995) y en las últimas décadas el volumen de agua del lago ha disminuido, debido principalmente al asolve (Filonov, 1998). La pérdida de agua se relaciona con la calidad de la misma, provocando con ello florecimientos periódicos de lirio (*Eichhornia crassipes*) y de cianofitas, baja productividad del fitoplancton debido a la limitación lumínica y disminución en los volúmenes de captura de las especies nativas (Lind y Dávalos-Lind, 2002). El lago también enfrenta serios problemas de contaminación ya que los niveles de eutrofización y metales pesados son alarmantes (Rojas Carrillo y Sasso Yada, 2005).

Lago de Pátzcuaro

El lago de Pátzcuaro (Figura 1) se ubica en la porción centro-norte del estado de Michoacán en los 19°32'-19°42' N y los 101°32'-101°42' O, con una altitud promedio de 2035 msnm (Chacón-Torres *et al.*, 1991) y un área máxima de 116 Km² (Gomez-Tagle *et al.*, 2002). Está limitado al este por las Sierras de Santa Clara y Tingambato, al oeste por las sierras de Pichataro y Comanja, al norte por el Pico de Zirate y el Cerro del Tigre y al sur por los Cerros del Frijol y de Cantera (INEGI, 1988). Es una cuenca endorreica cuya formación se relaciona con la intensa actividad tecto-volcánica ocurrida durante el Terciario tardío y el Cuaternario (hace 5 y 2 millones de años respectivamente) (De Buen, 1945; Barbour, 1973 a).

Los principales problemas que enfrenta desde años atrás son: *a)* la disminución del vaso lacustre debida a la excesiva acumulación de sedimentos (Chacón Torres, 1993; O'Hara *et al.*, 1993; Bernal-Brooks *et al.*, 2002) y a las variaciones climáticas de la región (Gómez-Tagle *et al.*, 2002); *b)* la eutrofización de sus aguas; *c)* la introducción de especies provenientes de otros embalses, lo cual ha provocado fluctuaciones de las especies locales a través del tiempo y cambios en la estructura trófica (Berlanga-Robles *et al.*, 1997; 2002); *d)* la sobrepesca (Jiménez-Badillo y Gracia, 1995) y *e)* programas de recuperación de especies que favorecen potencialmente la hibridación entre las especies de atherinópsidos del lago (Dr. García de León, CIBNOR, *com. per.*).

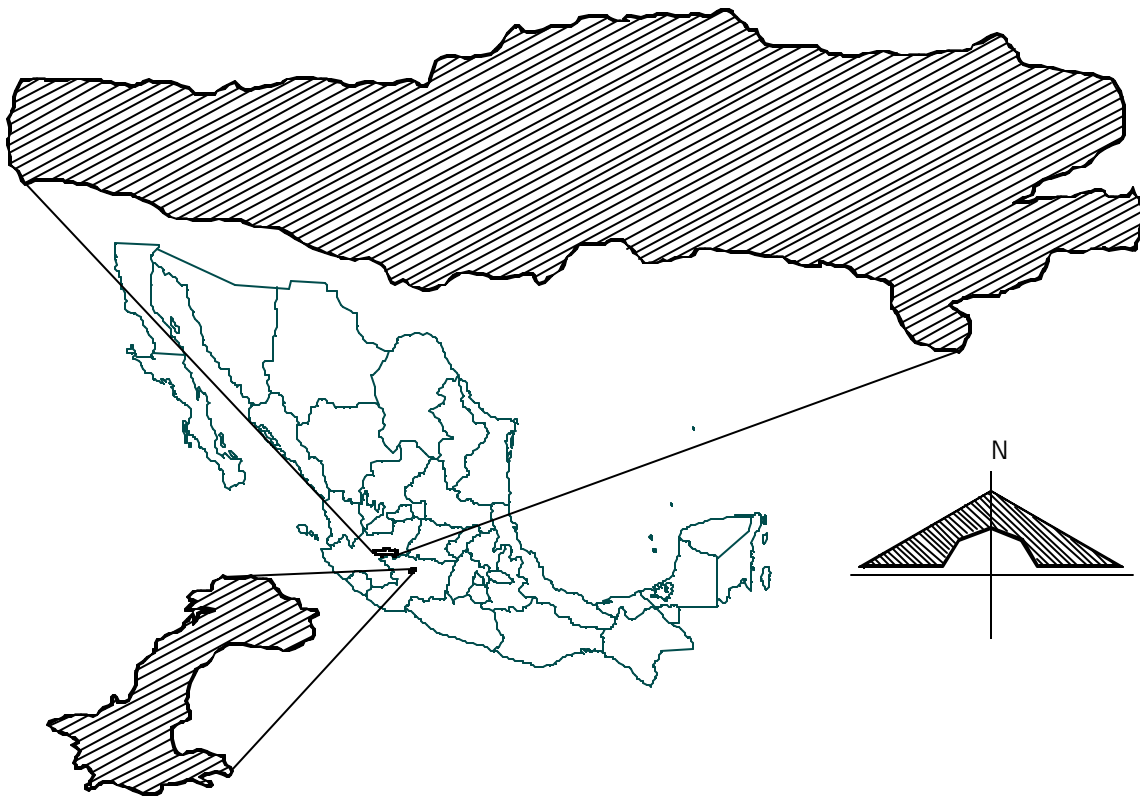


Figura 1. Ubicación geográfica de los lagos de Chapala y Pátzcuaro.

V. MARCO TEORICO

V.1 EL GENERO *Chirostoma*

V.1.1 Hipótesis acerca del origen de los Aterinópsidos

Parte de la ictiofauna dulceacuícola mexicana ostenta un origen marino, el cual ha sido explicado por la invasión de diversos grupos provenientes del océano (tanto del Pacífico como del Atlántico). Estos grupos debido a la gran inestabilidad geológica de la Mesa Central de México, quedaron aislados dando origen a un gran número de elementos endémicos (Miller, 1966) como es el caso de la familia Atherinopsidae.

Existen tres hipótesis principales acerca del origen de los aterinópsidos: Álvarez del Villar (1972), propuso que algunos organismos marinos provenientes del Atlántico quedaron atrapados en un mar interior que ocupó parte de la Mesa Central, y posteriormente iniciaron su diversificación en *Chirostoma* y *Poblana*. También sugirió la presencia de un ancestro semejante a *Chirostoma jordani* como habitante del gran lago conformado por las cuencas de México, la Oriental (Puebla) y la región de los Llanos, dentro del cual (después del Pliopleistoceno, hace 2 millones de años aprox.) y como resultado de la actividad volcánica, se formaron los cráteres de Quechulac, Alchichica y la Preciosa. Dichos cráteres quedaron inundados, para posteriormente independizarse del gran cuerpo de agua en función de la altura de sus bordes. De ésta manera, con los cambios en el patrón de drenaje, las poblaciones de *Chirostoma jordani* quedaron aisladas en cada uno de los lagos-cráter, iniciando así los procesos de diferenciación del género *Chirostoma*.

La segunda hipótesis, planteada por Barbour (1973 b), sugiere que el género tiene un origen difilético durante el Terciario (5-65 millones de años), cuando un ancestro similar a *Menidia* penetró a los ambientes dulceacuícolas mexicanos proveniente del Atlántico y debido a la constante actividad volcánica y cambios en el patrón de drenaje, quedó aislado dando origen al grupo *Jrdani*, el cual alcanzó una amplia distribución. Mientras este grupo divergía, a

finales del Mioceno (hace 25 millones de años aprox.), una forma similar a *Melaniris* (*Atherinella*) entró a territorio mexicano por el Pacífico, dando origen al grupo Arge, el cual quedó restringido en su área de distribución debido a la presencia del mencionado grupo Jordani. Además, el autor asumió que cuando menos para los *taxa* simpátridos, la diversificación de las especies ha sido producto de la especialización alimenticia (Barbour, 1973 a), la cual promovió con el tiempo la diferenciación morfo-funcional del aparato bucal y del cuerpo de estos atherinópsidos.

La tercera hipótesis, concebida con base en evidencias geológicas, biogeográficas y paleontológicas fue presentada por Miller (1966), Miller y Chernoff (1979) y Miller y Smith (1986). En ella se argumentó que entre el Plioceno y el Pleistoceno (hace 5 y 2 millones de años, respectivamente) una especie semejante a *Menidia* logró entrar desde las costas del Atlántico a las aguas epicontinentales mexicanas a través del Río Bravo, el cual se conectaba a la Mesa Central por medio de otro río encauzado hacia el sur. Debido a la actividad geológica, la comunicación entre ambos cuerpos se vio suspendida y las poblaciones, al quedar aisladas, divergieron y se dispersaron por toda la Mesa Central, dando origen a los géneros *Chirostoma* y *Poblana*.

Barbour y Chernoff (1984) con datos osteológicos apoyaron esta última hipótesis, al igual que Echelle y Echelle (1984), quienes analizaron la distribución y situación taxonómica de 15 de las 18 especies del género *Chirostoma*, así como dos especies de *Poblana* y dos especies de *Menidia*, concluyendo por medio de la caracterización de la diversidad aloenzimática que *Poblana* y *Chirostoma* comparten con *Menidia* un ancestro no compartido con otros atherinópsidos y que el proceso de especiación de estos géneros ocurrió de manera rápida, una vez que el ancestro *Menidia* invadió la Mesa Central de México.

V.1.2 Ubicación taxonómica

Actualmente, la taxonomía que se maneja es la sugerida por Barbour (1973 *a* y *b*), quien después de varios análisis morfológicos reconoció a un solo género integrado por 18 especies y seis subespecies, divididos en dos grupos diferentes: el grupo Jordani y el grupo Arge. Estos difieren principalmente por el tipo de escamas: el grupo Jordani presenta escamas lacineadas con canales, mientras que las escamas del grupo Arge presentan poros. El grupo Jordani incluye especies de talla relativamente pequeña (*Chirostoma jordani* Woolman, 1894, *C. patzcuaro* Meek, 1902 y *C. chapalae* Jordan y Snyder, 1899) y un grupo de especies originadas a partir de un ancestro parecido a *C. humboldtianum* (Barbour, 1973 *b*; Barbour y Chernoff, 1984; Echelle y Echelle, 1984; White, 1985), las cuales por radiación adaptativa incrementaron su tamaño, número de escamas, número de branquiespinas y vértebras (Barbour, 1973 *b*). Dicha radiación incluye a *C. lucius* Boulenger, 1900, *C. sphyraena* Boulenger, 1900, *C. estor* Jordan, 1879, *C. promelas* Jordan y Snyder, 1899, *C. consocium* Jordan y Hubbs, 1919, *C. grandocule* Steindachner, 1894 y *C. humboldtianum* Valenciennes, 1835 (Barbour, 1973 *b*). El resto de las especies y una subespecie (*C. arge* Jordan y Snyder, 1899, *C. melanocus* Álvarez, 1963, *C. riojai* Solórzano y López, 1965, *C. charari* De Buen, 1945, *C. attenuatum attenuatum* Meek, 1902, *C. attenuatm zirahuen* Meek, 1902, *C. bartoni* Jordan y Evermann, 1900, *C. aculeatum* Barbour, 1973 (*a*) y *C. labarcae* Meek, 1902) han sido situadas dentro del grupo Arge, que se caracteriza por presentar valores menores en caracteres merísticos.

Por medio del análisis comparativo del aparato branquial de 16 especies del género, González Díaz (2000) reportó que todas y cada una de las mismas pueden ser identificadas y tratadas como entidades taxonómicas verdaderas ratificando la presencia dentro del género de los grupos Jordani y Arge y apoyando lo propuesto por Barbour (1973 *a*).

Para el reconocimiento morfotípico y taxonómico de las especies de peces blancos con respecto a las categorías supragenéricas se consideró lo señalado por Dyer y Chernoff (1996); mientras que para las categorías infragenéricas se contempló lo propuesto por Barbour (1973 *a*):

Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata
Grupo Gnatostomata
Superclase Pisces
Clase Osteichthyes
Subclase Actinopterygii
Superorden Teleostei
Orden Atheriniformes Rosen
Familia Atherinopsidae Fowler
Subfamilia Menidiinae Schultz
Tribu Menidiini Shultz
Género *Chirostoma* Swainson
Especie *Chirostoma estor* Jordan, 1879
C. humboldtianum Valenciennes, 1835
C. lucius Boulenger, 1900
C. promelas Jordan y Snyder, 1899
C. sphyraena Boulenger, 1900

Cabe mencionar que existe controversia a nivel de género con respecto al reconocimiento de *Chirostoma* y *Poblana* como tales, ya que presentan homoplasias debido quizá a que su historia evolutiva es semejante (Miller, 1966; Barbour, 1973 *b*). Los autores Echelle y Echelle (1984) sugirieron que dichos géneros deben ser integrados en uno solo. En éste mismo contexto, Coyote (2000) analizó las relaciones taxonómicas entre ambos géneros empleando la técnica de los marcadores RAPD (por sus siglas en inglés Random Amplified Polymorphic DNA Markers, ADN Polimorfo Amplificado al Azar), puntualizando que a nivel intergenérico el 0.87 % de los marcadores RAPD son exclusivos para ambos géneros, y que debido al traslape es necesaria una revisión taxonómica para determinar su estado real. En 2003, Ruíz Castillo concluyó, después de analizar las secuencias nucleotídicas de un fragmento de la región control mitocondrial en tres especies de *Poblana* y siete especies del género *Chirostoma*, que el número de sustituciones nucleotídicas de las secuencias del género

Poblana no fue suficientemente grande como para poder distinguir especies dentro del mismo, mientras que las especies del género *Chirostoma* sí pudieron distinguirse como verdaderas unidades taxonómicas a excepción de *C. jordani*, cuya separación como unidad taxonómica de *Poblana* no fue justificable. Además, la edad de las especies estimada a partir del porcentaje de diferencias promedio de las secuencias, fue mayor a las edades calculadas para los lagos-cráter de la Cuenca Oriental, contrastando con lo sugerido por Álvarez del Villar (1972). Dicha controversia podría ser resultado de una definición inadecuada de especie y sus consecuencias en la nomenclatura taxonómica y también de la alta plasticidad fenotípica existente en el género (en algunos casos y en trabajos pioneros podrían haberse reconocido como especies dos unidades biológicas variantes al interior de una misma especie). Esto explicaría el gran número de especies del género *Chirostoma* y el alto traslape de caracteres morfológicos entre las mismas.

V.1.3 Características relevantes de las especies

***Chirostoma estor* (Jordan, 1879)**

Nombre común: Pez blanco, Churucha y huerepo (P'urhépecha, De Buen, 1940 a); Kurucha urapiti (P'urhépecha, Chacón-Torres *et al.*, 1991).

Su distribución nativa actual se restringe al lago de Pátzcuaro, aunque ha sido trasplantado al lago de Chapala, en donde su abundancia es escasa comparada con las otras especies del género presentes (Barbour y Chernoff, 1984). Inclusive, en algunos trabajos no se reporta su existencia (Moncayo Estrada *et al.*, 2003); de manera local, su distribución cambia estacionalmente (Barriga Sosa, 2001). Es un pez pelágico que vive en aguas lénticas (De Buen, 1940 a). La cabeza es grande, triangular y cubierta de escamas, el cuerpo es alargado, fusiforme y esbelto (Barbour 1973 a). Tiene hábitos carnívoros durante todos sus estadios de vida, aunque su dieta cambia a través de los mismos. La reproducción ocurre durante la mayor parte del año en ambiente natural (Soria-Barreto *et al.*, 1998), los desoves son múltiples y su talla mínima reproductiva reportada es de 108 mm (García de León, 1984); los organismos son ovíparos sin cuidados parentales después del desove, los huevos presentan de 2 a 10 filamentos firmes en su capa externa, los cuales tienen como función principal la

fijación a la vegetación (De Buen, 1940 *b*). Se considera una especie poco tolerante, ya que requiere buena calidad de agua, por lo cual se ha visto seriamente afectada debido al deterioro ambiental.

Chirostoma estor constituye un recurso de valor comercial elevado en el mercado (25 USD/Kg) pero, dada la sobreexplotación pesquera que sufre desde hace un par de décadas, los volúmenes de captura han disminuido drásticamente (Chacón-Torres y Rosas-Monge, 1995). Otro problema que enfrenta es su identificación, dada la dificultad en la determinación de organismos juveniles y, por lo tanto, la separación de éstos de otras especies de tallas menores. Además, debe considerarse que ha sido introducido en más de 150 embalses con la finalidad de ser cultivado (Rosas, 1970).

***Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835)**

Nombre común: Charal de aleta corta, charal de Xochimilco (Martín del Campo, 1955); amilotl (López, 1991).

En la actualidad, se encuentra en la Laguna de Zacapu y en el lago de Pátzcuaro, Michoacán (en éste último embalse fue introducido); en el Estado de México, en los embalses de Trinidad Fabela, Huapango, Tiacaque, Danxhó y Tepuxtepec; así como en el lago de Xochimilco (Paulo-Maya *et al.*, 2000). En los últimos años la especie ha ampliado su distribución hacia el sur de la cuenca Lerma-Chapala, ocupando porciones altas hasta los 2552 msnm (Dr. Díaz-Pardo, UAQ *com. per.*). Es un pez esbelto y comprimido (Barbour, 1973 *a*), con hábitos carnívoros. Se reproduce durante una buena parte del año, existiendo variaciones propias para cada cuerpo de agua que habita. La talla mínima de reproducción y la fecundidad también presentan diferencias geográficas (Paulo-Maya *et al.*, 2000).

Chirostoma humboldtianum es una de las especies de peces blancos con estudios y avances recientes para desarrollar su cultivo (Blancas Arroyo *et al.*, 2003; Cárdenas Reygadas, 2003).

***Chirostoma lucius* (Boulenger, 1900)**

Nombre común: Ojón (Morelos y Guzmán Arroyo, 1995).

La especie ha sido reportada en los lagos de Chapala (Barbour, 1973 *a*; Barbour y Chernoff, 1984) y de Pátzcuaro, en este último como introducida (Alaye-Rahy, 1993). A diferencia de las otras especies de peces blancos, *C. lucius* no suele estar condicionada por la temperatura del agua ni por la cantidad de oxígeno disuelto; se distribuye en toda la columna de agua. En el lago de Chapala se encuentra principalmente en la zona noreste (Guzmán Arroyo y Ortiz Martínez, 1995). Se caracteriza por presentar la mandíbula inferior más proyectada con respecto a la superior (Barbour, 1973 *b*). Es un organismo consumidor de tercer orden, que se alimenta preferentemente de insectos, decápodos y peces (Moncayo Estrada *et al.*, 2003). La época de reproducción inicia en los meses más fríos del año (diciembre-enero), concluyendo en abril; la talla de primera madurez en los machos es de 130 mm y en las hembras de 140 mm (Guzmán Arroyo *et al.*, 1995).

En el lago de Chapala, *Chirostoma lucius* representa el mayor volumen de las capturas comerciales en cuanto a peces blancos se refiere (Moncayo Estrada *et al.*, 2003), aunque en algunos trabajos, la recolecta de organismos de esta especie presenta bajas densidades (Barriga-Sosa *et al.*, 2002).

***Chirostoma promelas* (Jordan y Snyder, 1899)**

Nombre común: Pico negro (Morelos y Guzmán Arroyo, 1995), charal boca negra.

Su distribución está restringida al Lago de Chapala, encontrándose localmente en las zonas someras y de mayor turbidez. Se caracteriza por presentar una cabeza triangular y el hocico pigmentado de negro (Barbour, 1973 *a*), razón por la cual debe su nombre común; el cuerpo es esbelto y comprimido, al igual que las otras especies de peces blancos. Aunque el conocimiento biológico de la especie es escaso, se sabe que los hábitos alimenticios van cambiando durante el desarrollo, convirtiéndose en un ictiófago estricto cuando alcanza la

edad adulta, depredando a especies congéneres (Arriaga Haro *et al.*, 1995; Villacaña Vázquez y Morales Ventura, 2003) y que dentro del lago presenta migraciones alimenticias (Guzmán Arroyo y Ortiz Martínez, 1995). La época reproductiva comprende los meses de noviembre a febrero, siendo diferente a la presentada por *C. lucius* y *C. sphyraena*, también presentes en este embalse (Moncayo Estrada *et al.*, 2003).

Chirostoma promelas constituyó un recurso pesquero de importancia, pero en la actualidad la población se encuentra mermada debido a problemas de sobrepesca y deterioro ambiental (Filonov, 1998) por lo que se considera especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2001.

***Chirostoma sphyraena* (Boulenger, 1900)**

Nombre común: Dientón (Morelos y Guzmán Arroyo, 1995), charal boca grande.

Al igual que *C. promelas*, *C. sphyraena* se encuentra exclusivamente en el lago de Chapala (Barbour, 1973 *a*; Barbour y Chernoff, 1984; Morelos y Guzmán Arroyo, 1995), donde suele restringir su distribución a zonas colonizadas por algas y con altas concentraciones de oxígeno y otros gases disueltos (Moncayo Estrada *et al.*, 2003). Tiene cuerpo delgado y alargado, hocico pronunciado y con dientes grandes, similares a los de una barracuda (Barbour, 1973 *b*). Se alimenta de peces, preferentemente de especies congéneres como el charal *C. jordani* (Arriaga Haro *et al.*, 1995). Por lo que respecta a la época de reproducción, se sabe que comprende los meses de octubre a enero, aún cuando pocos estudios se han enfocado al ciclo reproductivo de dicha especie.

Tradicionalmente, las capturas comerciales de *Chirostoma sphyraena* en el lago de Chapala han representado un volumen menor comparado con los reportados para sus congéneres *C. lucius* y *C. promelas*, aunque de igual forma se presume una disminución en la densidad de las poblaciones locales (Moncayo Estrada *et al.*, 2003) razón por la cual, los volúmenes de captura no se reportan en la Carta Nacional Pesquera (2004).

V.2 CARACTERES MORFOLOGICOS

Descripción y aplicaciones

Un carácter morfológico es cualquier característica visible cuantitativa o cualitativa que puede ser registrada y comparada por diversos autores. Ejemplos de ellos son: los caracteres merísticos, los morfométricos, los osteológicos y la coloración (Lagler *et al.*, 1990).

Los caracteres morfológicos se emplean para identificar taxonómicamente a los organismos y además permiten determinar diferencias o similitudes entre jerarquías, así como la relación de parentesco entre las mismas (Winston, 1999).

Los caracteres merísticos son aquellos cuantificables en unidades discretas (números enteros) por ejemplo: escamas, vértebras, branquiespinas, etc. Pueden ser influenciados substancialmente por factores ambientales durante el desarrollo temprano (Pepin y Carr, 1993) y existen reportes de su variación con respecto a la talla del organismo dentro y entre especies (Strauss y Bond, 1990; Takeyama *et al.*, 2001). Con respecto a los caracteres morfométricos, son variables continuas que pueden medirse en milímetros (mm), ya sean distancias o longitudes del cuerpo, y también suelen presentar variaciones entre especies e incluso entre sexos (Ibañez Aguirre y Leonart, 1996).

V.2.1 Técnicas morfológicas

Debido a la necesidad de comparar datos morfológicos entre autores y años, las técnicas más empleadas en el análisis de datos morfológicos son estadísticas, aunque también existen otras meramente visuales como censos o fotografías (Strauss y Bond, 1990). Dentro de las primeras se encuentran el análisis univariado y el análisis multivariado (Sokal y Rohlf, 1981).

Los análisis estadísticos univariados consisten, esencialmente, en describir una sola variable mediante características muestrales, o realizar inferencias sobre la información de una muestra obtenida bajo una o varias condiciones experimentales. Entre las pruebas

univariadas más empleadas se encuentran la media y la varianza muestrales, la prueba de t y el análisis de varianza (Degroot, 1988; Milton y Tsokos, 1989).

El análisis multivariado en cambio, es un conjunto de métodos estadísticos y matemáticos para analizar, describir e interpretar las observaciones multidimensionales, es decir, el material estadístico que proviene de más de una variable, que puede ser de tipo cuantitativo, cualitativo e incluso una mezcla de ambos (Cuadras, 1991). Incluye las técnicas del análisis univariado y del bivariado (Hair *et al.*, 1992), considerando que las n variables son dependientes, de naturaleza similar y que ninguna de ellas tiene una importancia superior a las demás (Calvo Gómez, 1993). Es una metodología estadística complicada, pero también potente, utilizada para encontrar las relaciones entre caracteres determinando cuales son las variables de mayor peso, es decir, aquellas capaces de establecer diferenciación. Tanto en biometría como en morfología, los métodos multivariados se emplean cuando los caracteres están tan relacionados que por sí mismos no pueden separar a las especies y/o poblaciones (Vreven *et al.*, 1998).

V.3 MARCADORES GENETICOS

Descripción y aplicaciones

Un marcador genético es cualquier molécula heredable a la que se le puede dar seguimiento, también se define como la constitución parcial o total de un fragmento de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) desconocido o de una secuencia o gen en particular que puede ser analizado en individuos o en poblaciones (García de León, 2001).

El ADN se encuentra en todas las células de un organismo y, comparado con el polimorfismo de las proteínas (aloenzimas o isoenzimas), presenta mayor variación (Mitton, 1994). De acuerdo con Dowling *et al.* (1990), las principales ventajas de trabajar marcadores moleculares son: *a)* una o más secuencias pueden ser seleccionadas para resolver un problema determinado, dependiendo de su tasa evolutiva y el tipo de herencia; *b)* el ADN puede ser extraído a partir de pequeñas muestras de tejido y *c)* de manera general, cualquier técnica molecular puede ser empleada.

En las últimas décadas, diversas herramientas moleculares han permitido la resolución de distintos problemas a nivel poblacional y/o específico, no sólo en evolución, genética de poblaciones o filogeografía, sino también en ecología (Parker *et al.*, 1998). En peces, estos avances han permitido la inclusión de los marcadores moleculares en cuestiones de manejo y conservación de especies (Ferguson *et al.*, 1995; Ferguson y Danzmann, 1998).

En términos generales, los marcadores moleculares contribuyen a diversos estudios, como (Vrijenhoek, 1998):

- * Problemas taxonómicos de dificultad en diversos grupos de organismos;
- * Diseño de programas de hibridación;
- * Conocimiento de sistemas naturales de hibridación;
- * Determinación de la diversidad dentro y entre poblaciones;
- * Flujo de genes y
- * Conocimiento de los factores que influyen en la adaptación o *fitness*.

El genoma mitocondrial

Las mitocondrias son organelos celulares propios de organismos eucarióticos, donde ocupan una porción importante del citoplasma. En animales, su función principal es regular la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (producción de ATP) (Alberts *et al.*, 2002).

La mitocondria posee ADN propio, el cual representa menos del 1% del genoma total de la célula en mamíferos. El tamaño total de este genoma oscila entre las 6 y las 2000 kilobases (kb). Típicamente, en vertebrados, cada genoma mitocondrial está compuesto por 37 genes funcionales distintos (22 que codifican para diferentes ARNs de transferencia, dos ARNs ribosomales *12S* y *16S* y trece ARNs mensajeros) y una región control. En contraste con los genes nucleares, los mitocondriales no contienen intrones y comúnmente están separados por menos de 10 pares de bases (Meyer, 1993). El ADN mitocondrial tiene dos importantes características: una tasa de mutación alta y una transmisión en su mayoría materna (Avice, 1994; 2000). Este tipo de herencia impide que la molécula sufra recombinación, aunque existe evidencia de que también es heredado vía paterna en mejillones del género *Mytilus* (Zouros *et al.*, 1994) y en humanos (Ankel-Simons y Cummins, 1996), sugiriéndose en estos casos una herencia biparental.

La evolución del ADN mitocondrial se debe a mutaciones genéticas (sustitución, ganancia y/o pérdida de nucleótidos) que son transmitidas a las generaciones sucesivas mediante el proceso de replicación. Por ello, los niveles de variación entre poblaciones tienden a ser significativamente más altos que los encontrados dentro de una misma población (Dowling *et al.*, 1990). Varios estudios muestran que las tasas de sustitución son mayores en ADN mitocondrial que en regiones que codifican para ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979).

Para grupos de animales estrechamente emparentados, el ADN mitocondrial es un buen marcador molecular para determinar variación genética entre poblaciones, especies y géneros así como para establecer filogenias (Adachi *et al.*, 1993; Faber y Stepien, 1997): considerando la tasa evolutiva de la familia, género o especie, se seleccionan la(s) secuencia(s) que ayude(n) a resolver el problema planteado.

Región control mitocondrial

La región control del ADN mitocondrial ha sido postulada como la región más variable dentro del genoma mitocondrial, ya que su tasa evolutiva es más rápida (2 a 5 tiempos) comparada con los genes mitocondriales que codifican proteínas (Meyer, 1993). Por ello, se le considera como el mejor marcador molecular para inferir variación genética entre poblaciones y/o muestras así como relaciones filogenéticas (Kornfield y Parker, 1997; Parker *et al.*, 1998), consta de un dominio central altamente conservado y a los extremos de éste, dos dominios hipervariables. En peces, puede considerarse de gran tamaño (entre 908 y 1248 pares de bases pb en la familia Percidae, de acuerdo con Faber y Stepien, 1997) (Figura 2).

La región conocida como *D-Loop* (*Displacement loop*) forma parte de la región control y está involucrada en los procesos de replicación del ADN mitocondrial y de transcripción del ARN (Awise, 2000).

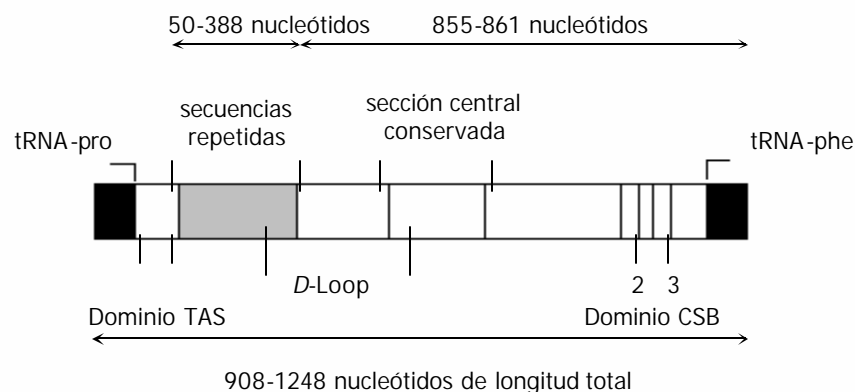


Figura 2. Estructura y sitios de variación de la región control del ADN mitocondrial en peces. En los extremos se observan las secuencias que codifican para ARN de transferencia (5' prolina y 3' fenilalanina), los dominios TAS (secuencias asociadas a la terminación) y los dominios CSB 2 y 3 (cajas de secuencias conservadas). En el centro, la región más conservada (Basado en Faber y Stepien, 1997).

Gen mitocondrial para el ARN ribosomal 16S

Las secuencias de ARN son ampliamente usadas para inferir relaciones filogenéticas. Dentro de las ventajas de emplear ARN ribosomal se encuentran: la relativa facilidad con la cual pueden ser secuenciadas regiones determinadas y la constitución de las mismas, ya que incluyen dominios conservados y variables (Cilia *et al.*, 1996).

El ARN ribosomal 16S (1571-1640 pb en vertebrados) forma junto con el ARN ribosomal 12S (819-975 pb en vertebrados), un complejo involucrado en el proceso de traducción del mensaje genético. Sus genes presentan tasas de mutación mayores en comparación con los genes para ARN ribosomal presentes en la subunidad pequeña (r12S) y con los genes funcionales, aunque paradójicamente se considera que el gen r16S está altamente conservado tanto en su estructura como en su función (Watson *et al.*, 1987). Estos cambios pueden ser usados para discriminar poblaciones o especies así como para inferir relaciones filogenéticas. Con respecto a los genes nucleares ribosomales (18S y 28S), los genes mitocondriales ribosomales 12S y 16S presentan una tasa de cambio mayor (en un orden de aproximadamente 100 veces) en menor tiempo (Dawid, 1972).

V.3.1 Técnicas moleculares

Dentro de las técnicas moleculares, las más empleadas son: el análisis de la longitud de los fragmentos del polimorfismo (RFLP's, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), el ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD's, *Randomly Amplified Polymorphic DNA's*), los *loci* de Caracteres Cuantitativos (QTL's, *Quantitative Trait Loc*) y la secuenciación de regiones o genes. Todas ellas utilizan fragmentos del genoma amplificados vía PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa), técnica básica que permite realizar amplificaciones *in vitro* de una secuencia específica de ADN por medio de una polimerasa termoestable (Mitton, 1994). Para ello, es necesario el conocimiento de las secuencias que flanquean la región a amplificar; estas secuencias de oligonucleótidos son sintetizadas de manera química automatizada, recibiendo el nombre de iniciadores o cebadores, y en inglés *primers* (Palumbi, 1996). Estos *primers* han sido diseñados para

secuencias específicas y altamente conservadas del genoma, pudiendo ser amplificadas en cualquier especie, razón por la que suelen ser denominados como universales (Kocher *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1990; Palumbi *et al.*, 1991).

Básicamente, la reacción de PCR consta de tres pasos: la desnaturalización o separación de las dos hebras de ADN mediante temperaturas elevadas, la hibridación o anillamiento de los iniciadores con la hebra complementaria de ADN y la elongación o extensión de la cadena de ADN (Cha y Thilly, 1995). La polimerasa más empleada en reacciones de PCR es la *Taq* (EC 2.7.7.7), aislada por primera vez en 1976 de la bacteria termofila *Thermus aquaticus*, desconociéndose en ese entonces el impacto de su aplicación en biología molecular (Landgraf y Wolfes, 1993). En 1985, apareció la primera publicación concerniente a la PCR (Saiki *et al.*) y tres años más tarde (Saiki *et al.*, 1988), se reportó el uso de la enzima *Taq* polimerasa. De acuerdo con Kidd y Ruano (1995) un protocolo no puede ser óptimo para todas las reacciones de PCR, razón por la cual es necesario perfeccionar las condiciones para cada caso específico.

Por lo que respecta a los RFLP's, los RAPD's, los QTL's, la secuenciación y otras técnicas moleculares, suelen diferir entre sí en cuanto a sus aplicaciones, niveles de resolución, costos y tiempos de implementación. A continuación se describen brevemente las técnicas empleadas en este trabajo.

Análisis de fragmentos de restricción enzimática

Las enzimas de restricción reconocen y cortan una secuencia específica de ADN bicatenario, típicamente de 4 a 6 pb. Cerca de 400 enzimas de restricción han sido aisladas de bacterias (puesto que su función es degradar o cortar ADN ajeno a estos microorganismos) y caracterizadas para su uso (Dowling *et al.*, 1990).

La técnica de análisis de fragmentos de restricción es una herramienta importante en el análisis de ADN. Los cambios en el número y/o tamaño de los fragmentos de ADN se deben a la inserción, delección o sustitución de bases, lo que puede resultar en la pérdida o ganancia

de sitios de restricción (Page y Holmes, 1998). Estos cambios pueden ser identificados mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, al visualizar los fragmentos de restricción y cotejarlos con un marcador de peso molecular conocido para determinar su tamaño (Dowling *et al.*, 1990).

Secuenciación

El análisis de la secuencia de nucleótidos es una técnica que permite determinar el orden preciso de las bases nucleotídicas en un gen o región determinada. Es por ello que ha sido la técnica más empleada para inferir historias filogenéticas (Hillis *et al.*, 1996).

Para obtener una secuencia en particular existen dos métodos: uno químico sugerido por *Maxam* y *Gilbert* y hoy prácticamente en desuso para este tipo de aplicación, y otro enzimático, descrito por *Sanger*. El método enzimático se basa en cuatro reacciones, cada una específica para cada base (A,C,G,T), generando una serie de fragmentos que por medio de electroforesis, aparecen en una de cuatro líneas (Page y Holmes, 1998). En la secuenciación automática, cada una de las cuatro bases puede ser reconocida por medio de un colorante diferente (*'dye terminators'*) en una sola placa o capilar mediante el uso de un láser.

CAPITULO I. DISCRIMINACION MORFOLOGICA

I.1 ANTECEDENTES

La morfología ha sido tradicionalmente el primer recurso para efectuar la discriminación de sexos y/o especies de peces (Tagliavini *et al.*, 1995; Ibañez Aguirre y Lleonart, 1996) y para describir los patrones de variación entre poblaciones y/o especies (Strauss y Bond, 1990). Los primeros trabajos enfocados en la descripción morfológica de las especies que conforman el género *Chirostoma* fueron realizados a finales del siglo XIX y principios del XX por Jordan y Snyder (1899), Meek (1902) y Jordan y Hubbs (1919); posteriormente, De Buen (1940 *a* y *b*, 1945), Álvarez del Villar (1970) y Barbour (1973 *b*), contribuyeron al presentar valores promedio e intervalos (inclusive desviación estándar) para un amplio número de variables morfométricas y merísticas útiles para efectuar la discriminación de especies. Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad, la taxonomía del género es difícil dada la homogeneidad morfológica y plasticidad genética de estas especies. De acuerdo con Beheregaray y Levy (2000), otros géneros de atheriniformes como *Odontesthes* presentan el mismo problema.

Posteriormente, en 1984, Barbour y Chernoff, utilizaron el Análisis de Componentes Principales (ACP) con 19 variables morfométricas y 7 merísticas para discriminar a los peces blancos del lago de Chapala, argumentando que ocho variables morfométricas relacionadas con la cabeza y la habilidad natatoria explican la mayor variación y son suficientes para discriminar entre *Chirostoma promelas*, *C. lucius* y *C. sphyraena*. Los autores, sin embargo, reportaron problemas para la identificación de algunos organismos recolectados y alto traslape de caracteres, lo que les hizo suponer la presencia de híbridos en dicho embalse. Asimismo, reportaron la existencia de *C. estor*.

En 1992, en Pátzcuaro, Rincón Calderón analizó morfológicamente 51 organismos de talla mayor a los 120 mm, los cuales fueron identificados como *Chirostoma estor*, *C. grandocule*, *C. humboldtianum* y *C. lucius* (y algunos otros fueron reportados con características de dos o

más especies). Alaye-Rahy (1993) retomó éste último trabajo y aumentó el número de muestra (142), reportando un alto traslape de caracteres como principal problema para una adecuada discriminación, por lo que sugirió el desarrollo y empleo de técnicas más específicas. Además, confirmó la presencia de *C. lucius*, especie nativa del lago de Chapala e introducida en Pátzcuaro.

Barriga-Sosa (2001), empleó 27 caracteres morfológicos: 19 morfométricos y ocho merísticos (sugeridos por Barbour, 1973 *b*) y análisis multivariado (Análisis de Componentes Principales [ACP] y Análisis Discriminante [AD]) para discriminar a las cinco especies de peces blancos, señalando que los intervalos encontrados corresponden con los reportados por Barbour (1973 *b*), aunque existe una gran complejidad entre caracteres, al presentar gran traslape en los mismos. Por ello sugirió el empleo de caracteres merísticos y moleculares para efectuar la discriminación. En 2003, Pérez-Ramírez discriminó en estadio juvenil a la especie *Chirostoma humboldtianum* de sus congéneres por medio del número de branquiespinas, carácter merístico que presentó el valor mínimo (19) reportado por Barbour (1973 *b*). Posteriormente, Barriga-Sosa *et al.* (2005) discriminaron a las especies *C. estor* y *C. humboldtianum* del lago de Pátzcuaro empleando caracteres merísticos; estos resultados fueron corroborados con los obtenidos en el análisis de fragmentos de restricción del gen mitocondrial *r16S*.

El género *Chirostoma* ha sido objeto también de estudios comparativos basados en mediciones de los aparatos mandibular (Rodríguez-Ruíz y Granado-Lorencio, 1988; Soria-Barreto y Paulo-Maya, 2005) y branquial (González Díaz, 2000). En estos trabajos se mencionó la existencia de diferenciación morfológica entre las especies analizadas.

En el presente trabajo se midieron once caracteres morfológicos, presuntamente diagnósticos, para discriminar especies de peces blancos de acuerdo con Barbour (1973 *b*) en 28 organismos del género *Chirostoma*. Los datos obtenidos fueron comparados con la finalidad de seleccionar *a priori* a los individuos que mejor se ajustan al morfotipo (características morfológicas típicas de una especie) definido por dicho autor.

I.2 METODOLOGIA

I.2.1 Recolecta de muestras

Debido a los problemas serios de disminución de las poblaciones de las especies de estudio, la recolecta estuvo limitada a la disponibilidad de las mismas en ambos lagos. Por lo anterior, los organismos fueron donados por instituciones que cuentan con los permisos de captura correspondientes y/o cultivos de las especies objeto de estudio. Para efectuar la discriminación morfológica fueron analizadas tres poblaciones: dos silvestres provenientes de los lagos de Pátzcuaro y Chapala y una cultivada (Tabla 1); en total se analizaron 28 organismos en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola (PExPA) de la UAM Iztapalapa.

Tabla 1. Procedencia de las poblaciones analizadas.

Población	Procedencia	Ubicación	Status	<i>n</i>	Año	M C
Pátzcuaro	Lago de Pátzcuaro	Michoacán	silvestre	10	2003	etanol 100%
Chapala	CIIDIR-IPN	Jalisco	silvestre	8	2000-2002	congelada
Tizapán	C. A. Tiz.	Jalisco	cultivada	10	2004	congelada

Instituciones de procedencia: CIIDIR-IPN= Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Jiquilpan–Instituto Politécnico Nacional; C. A. Tiz.= Centro Acuícola Tizapan, Chapala; *n* = tamaño de muestra; M C= método de conservación.

Los organismos provenientes del lago de Pátzcuaro fueron recolectados por el Dr. Francisco García de León en tres localidades diferentes, de la siguiente manera: cinco organismos en Espíritu Santo, la cual se halla en la denomina zona Yunúen centro; dos organismos en Napizaro y tres en Ucasanastacua, ubicadas en la porción central del embalse.

I.2.2 Análisis morfológico

Se utilizaron los 11 caracteres morfológicos diagnósticos propuestos por Barbour (1973 *b*): seis merísticos y cinco morfométricos (Figura 3). Dentro de los caracteres merísticos se contaron: número de escamas de la línea lateral (ELL), número de escamas predorsales (EPD), número de escamas interdorsales (EID), número de branquiespinas (B), número de radios pectorales (RP) y número de radios anales (RA). Los caracteres morfométricos expresados en porcentaje con respecto a la longitud estándar fueron: longitud de la cabeza (LC), longitud del hocico (LH), longitud mandibular (LM), distancia del hocico a la primera aleta dorsal (DH1D) y altura de la aleta anal (AaA).

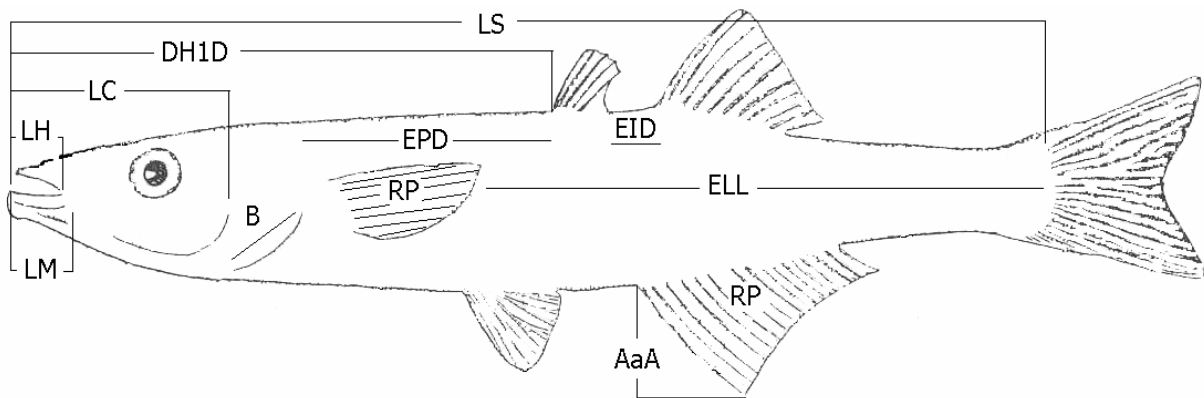


Figura 3. Caracteres morfológicos analizados en *Chirostoma*.

Los peces fueron medidos del lado izquierdo con vernier de acuerdo con Strauss y Bond (1990), Barriga-Sosa (2001) y Pérez-Ramírez (2003). Los caracteres merísticos se registraron bajo microscopio, siendo teñidas las escamas con azul de metileno, para la cuantificación de las escamas predorsales así como de las interdorsales. No se incluyó la escama anterior a la aleta respectiva, misma que suele ser denominada escama de hoz debido su forma (Dr. Paulo-Maya, ESCB-IPN, *com. per.*). Para cada carácter se determinaron el promedio y los valores máximos y mínimos, los cuales fueron comparados con los reportados por Barbour (1973 *b*), dado que los datos publicados por dicho autor son los empleados en la actualidad para discriminar a las especies del género *Chirostoma*.

I.3 RESULTADOS

Los 54 organismos analizados morfológicamente presentaron valores morfométricos y merísticos compatibles con los reportados por Barbour (1973 *b*) para las especies de peces blancos (*Chirostoma estor*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* y *C. sphyraena*), los cuales se describen a continuación por población.

Población Pátzcuaro

Los diez organismos analizados mostraron un patrón morfológico difícil de discernir debido al alto traslape de caracteres morfométricos y merísticos entre las cinco especies de peces blancos. La longitud patrón promedio de la población fue de 108 mm (94.5-148 mm). Todos, excepto el de mayor longitud estándar (148 mm), se ajustaron de manera general a los intervalos de caracteres morfométricos publicados por Barbour (1973 *b*), por lo cual este organismo no fue considerado para calcular el promedio de cada uno de los cinco caracteres, debido a que esta medida estadística suele verse afectada por valores elevados (Degroot, 1988). Con las gráficas reportadas en el trabajo de Barbour (1973 *b*) se construyó la Tabla 2, para describir los intervalos y promedios de las 11 variables diagnósticas que diferencian a las especies *Chirostoma estor*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* y *C. sphyraena*. Los intervalos y promedios de las mismas variables medidas en los individuos de cada población analizada (Pátzcuaro, Chapala y Tizapán) se muestran en la Tabla 3. La tabla 2 sirvió de referencia para comparar los resultados obtenidos en este estudio.

Población Chapala

Los individuos analizados provenientes del lago de Chapala presentaron valores de longitud estándar de 57.3-114 mm (promedio 67.1 mm). Se caracterizaron por tener hocico largo y puntiagudo, además una coloración negra de tenue a intensa. Es importante mencionar que algunos organismos se observaron modificados en algunas dimensiones naturales debido al método de conservación, lo cual influyó directamente en los valores de las mediciones efectuadas (Tabla 3).

Tabla 2. Intervalos y promedios de caracteres morfológicos diagnóstico en especies de peces blancos del género *Chirostoma* de acuerdo con Barbour (1973 b). Los caracteres morfométricos se encuentran expresados en porcentaje con respecto a la longitud estándar. Promedios entre paréntesis.

Carácter	<i>C. estor</i> <i>n</i> ?= 210	<i>C. humboldtianum</i> <i>n</i> ?= 972	<i>C. lucius</i> <i>n</i> ?= 75	<i>C. promelas</i> <i>n</i> ?= 20	<i>C. sphyraena</i> <i>n</i> ?= 77
ELL	65-91 (76)	43-73 (63)	52-75 (63)	52-68 (58)	60-82 (72)
EPD	56-108 (75)	24-50 (38)	50-117 (80)	44-68 (53)	56-111 (82)
EID	6-17 (11)	4-12 (6.5)	6-17 (11)	4-13 (8)	8-29 (18)
B	23-28 (25.2)	19-28 (23)	24-26 (26)	23-28 (24)	23-28 (25.5)
RP	12-16 (15)	13-17 (15)	14-17 (15.8)	12-16 (15)	14-18 (16.2)
RA	16-21 (19)	15-21 (17.8)	19-24 (21)	18-21 (19.2)	19-24 (21)
LH	10.5-12.3 (10.5)	8.4-13.4 (ND)	10.5-12.5 (ND)	ND	10.2-12.9 (ND)
LC	28-31.8 (30.5)	25.6-34.2 (ND)	30-32.5 (31.5)	29-32.5 (30.5)	28.5-32 (30)
LM*	12.2-14.8 (13.2)	10.8-12.2 (ND)	13.1-17.9 (15.7)	11.2-13.2 (12)	12.6-15.2 (13.8)
DH1D*	52-56 (53.8)	51.5-55.2 (ND)	52.9-57 (56.8)	55.2-58 (56.8)	52-56 (53.8)
AaA*	11.6-15.4 (13.5)	13.1-17.3 (ND)	15.0-17.7 (16.1)	15-16.1 (15.7)	13-16.5 (15.2)

La nomenclatura de los caracteres está referida en texto. *n* ?= tamaño de muestra promedio; *= estimaciones hechas en este trabajo a partir de los gráficos presentados en el artículo citado; ND= no disponible.

Población Tizapán

Los organismos donados por el Centro Acuícola Tizapán presentaron tallas entre los 65 y 180 mm de longitud patrón. Para los caracteres morfométricos longitud de la cabeza, longitud de la mandíbula y distancia del hocico a la primera dorsal expresados en porcentaje de longitud patrón, los valores registrados para algunos organismos fueron menores al mínimo

presentado por Barbour (1973 *b*) lo cual repercutió directamente en el promedio calculado (Tablas 2 y 3 respectivamente).

Tabla 3. Valores de los caracteres morfológicos analizados en las tres poblaciones de estudio. Los caracteres morfométricos se encuentran expresados en porcentaje con respecto a la longitud estándar. Promedios entre paréntesis.

Carácter	Pátzcuaro <i>n</i> = 10	Chapala <i>n</i> = 8	Tizapan <i>n</i> = 10
ELL	61-73 (66.9)	39-51 (41.6)	50-65 (58.1)
EPD	33-60 (39.2)	20-40 (23)	31-48 (43)
EID	11-19 (14.7)	4-6 (5.3)	9-14 (11.4)
B	22-26 (24.1)	16-20 (17.4)	20-24 (22)
RP	13-16 (14.6)	12-15 (12.6)	13-15 (13.4)
RA	17-21 (19.2)	18-21 (19.9)	19-21 (19.8)
LH	8.1-10.9 (30.5)*	6.4-11.0 (8.0)	7.8-10.7 (9.1)
LC	27.3-31.5 (30.1)*	24.4-30.5 (26.2)	26.2-29.6 (28.0)
LM	9.3-12.4 (10.2)*	8.7-11.0 (10.0)	10.4-12.1 (11.2)
DH1D	50.7-56.0 (54.3)*	54.8-59.6 (57.4)	49.2-56.9 (53.9)
AaA	14.0-15.8 (14.7)*	13.3-17.0 (15.7)	12.7-24.2 (16.4)

La nomenclatura de los caracteres se encuentra referida en el texto. *= los intervalos y promedios de los caracteres morfométricos se calcularon para nueve organismos (ver detalles en texto).

Al comparar las tablas 2 y 3 es claro que existe dificultad en el reconocimiento de especies para los individuos analizados en cada población. Estos resultados solo permiten suponer, mediante los valores morfométricos y merísticos registrados, que los organismos analizados son peces blancos y que la discriminación a nivel de especie no se puede realizar debido a tres causas: 1) el estado en el que se encuentran algunos individuos por el método de conservación, 2) el mencionado traslape de caracteres morfológicos y 3) el bajo número de organismos analizados.

I.4 DISCUSION

Como se mencionó con anterioridad, 27 de los 28 individuos analizados cumplen con el patrón general de los peces blancos, es decir, no pueden ser confundidos con los charales, considerando los intervalos definidos por Barbour (1973 *b*); el organismo restante, presentó valores morfométricos extremos (analizados en porcentaje con respecto a la longitud

estándar) que no coinciden con los reportados para ninguna de las especies del género *Chirostoma*, aunque los valores merísticos son concordantes con los propuestos por dicho autor para las cinco especies de peces blancos. Estos resultados podrían ser causa de: 1) la variación morfológica existente tanto entre especies del género como al interior de ellas (Barbour, 1973 *b*; Barriga Sosa, 2001; Barriga-Sosa *et al.*, 2002); 2) los trasplantes e introducciones de organismos del género *Chirostoma* a otros embalses, con registros y sin ellos (Alaye-Rahy, 1993), debido a que se ha relacionado el manejo inadecuado de algunas especies de peces de agua dulce con la dificultad de identificación por métodos tradicionales basados en marcadores morfológicos (Ferguson, 1990), tal y como ocurre también con las especies del género *Tilapia* (Seyoum y Kornfield, 1992); y 3) las posibles hibridaciones entre especies del género *Chirostoma*, ya que en 1996, en el lago de Pátzcuaro, Alaye-Rahy (*b*) argumentó la existencia de híbridos entre la especie nativa *C. estor* y la introducida *C. lucius*, al presentar los siete individuos analizados caracteres morfológicos compartidos como longitud del hocico, longitud mandibular y número de escamas de la línea lateral. Ahora bien, existen diversos estudios experimentales (Andrade Tinoco, 1990; Ledesma, 1990 y Estrada, 1991), en los cuales se reportó la capacidad de hibridación tanto entre especies de charales (*C. patzcuaro* con *C. grandocule* y *C. patzcuaro* con *C. attenuatum*) como entre peces blancos y charales (*C. estor* con *C. grandocule*) del lago de Pátzcuaro, aunque se desconoce si los híbridos pueden reproducirse. De acuerdo con Ferguson (1990) una limitante de los marcadores morfológicos es que en ocasiones los individuos con morfologías intermedias o compartidas suelen ser reconocidos como híbridos aun cuando el término en dicha circunstancia no es validado universalmente (Ferguson y Danzmann, 1987).

Es obvio que aún se requiere de un trabajo serio y extenso sobre el análisis morfológico de las especies de atherinópsidos en el área de distribución global; dicho análisis tendrá que tomar en cuenta diversos factores para planear la mejor estrategia metodológica a usar, tal como las transfaunaciones de charales y pescados blancos hechas por el gobierno estatal entre diferentes cuerpos de agua a lo largo de los últimos treinta años, las estrategias de fecundación artificial llevadas a cabo por los pescadores para incrementar las producciones de peces y con ello, la elevada probabilidad de haber provocado hibridaciones en este grupo de peces (Dr. García de León, CIBNOR *com per*).

Para las especies de peces blancos, las descripciones morfológicas propuestas por Barbour (1973 *b*) son las más empleadas hasta la fecha, debido quizá a: 1) el tipo de marcadores morfológicos empleados (morfométricos, merísticos y cualitativos), los cuales son relativamente fáciles de medir en individuos vivos o conservados en algún fijador y 2) el gran número de organismos analizados por especie y por localidad, lo cual suele relacionarse con la representatividad estadística de una población, sin ser esto necesariamente cierto (Dr. Méndez Ramírez, IIMAS-UNAM *com. per.*). Entre las desventajas se pueden mencionar: 1) el análisis exclusivo de organismos adultos; 2) el número de individuos analizados para cada variable en ocasiones presenta cambios abruptos; 3) el elevado traslape de caracteres morfológicos a nivel de especie, que suele complicar el empleo de descripciones y claves morfológicas y 4) la interpretación inadecuada de la variación morfológica así como sus factores causales. Además, debe considerarse (como se mencionó en el párrafo anterior) el manejo inadecuado del recurso, por lo cual las claves y descripciones morfológicas elaboradas por Barbour (1973 *b*) necesitan actualización. Por otra parte, los estudios morfológicos actuales (Alaye-Rahy, 1993; Alaye-Rahy, 1996 *a*; Barriga-Sosa, 2001) han sido poco conclusivos, presentándose incongruencia entre los datos reportados (Tabla 4).

Las incongruencias en los valores reportados pueden deberse principalmente a: I) el criterio utilizado para efectuar los conteos, el cual puede diferir de investigador a investigador; II) el estado en el que se encuentran los individuos, puesto que es sabido que algunos fijadores alteran tejidos, por lo que el uso inadecuado de los mismos puede provocar cambios en las dimensiones naturales (Strauss y Bond, 1990) al igual que la presencia de estructuras incompletas o desprendidas (aletas, escamas, etc.) por los procesos de captura (Barlett y Davidson, 1991); III) el error de paralaje, ya que las mediciones pueden variar entre personas y/o entre tiempos (Dra. Ibañez Aguirre, UAM-I *com. per.*); IV) la presentación de datos obtenidos (*p.ej.* mediciones morfométricas en milímetros –vs- expresadas en porcentaje de longitud estándar); V) la heredabilidad de los caracteres, punto que se desconoce para la mayoría de las características evaluadas en los estudios taxonómicos y VI) el tamaño de muestra empleado, el cual en los estudios morfológicos del género *Chirostoma* (Rincón-Calderón, 1992; Alaye-Rahy 1993 y 1996 *a*; Barriga-Sosa 2001; Barriga-Sosa *et al.*, 2002; Barriga-Sosa *et al.* en prensa) fue limitado. Estos seis factores deben ser considerados

al momento de realizar una evaluación morfológica, con la finalidad de reducir o eliminar fuentes de variación ajenas a los organismos analizados.

Tabla 4. Intervalos de algunas variables morfológicas descritas para poblaciones de *Chirostoma lucius*.

Variable	Barbour (1973 b) n= 75 ?C?	Alaye-Rahy (1993) n= 14 ?P?	Alaye-Rahy (1996 a) n=10 ?P?	Barriga Sosa (2001) n= 19 ?P?
Long. del hocico*	10.5-12.5	11.0-13.3	9.5-12.7	8.6-11.8
Long. mandíbula*	13.1-17.9	12.5-16.4	13.0-14.3	8.3-15.3
Long. aleta anal*	19.2-23.4	17.1-21.6	18.0-21.7	ND
Escamas predorsales	50-117	49-131	47-84	50-104

*= valores expresados en porcentaje con respecto a la longitud estándar; n= tamaño de muestra; n' = tamaño de muestra promedio; ?C?= población del lago de Chapala; ?P?= población del lago de Pátzcuaro; ND= no disponible.

Por lo que respecta a los caracteres cualitativos como coloración y forma, propuestos por De Buen (1940 a) y Barbour (1973 b) y calificados por Soria-Barreto *et al* (1998) y Paulo-Maya *et al.* (2000) como distintivos de las especies *Chirostoma estor* y *C. humboldtianum*, respectivamente, debe considerarse su limitada utilidad puesto que dichos caracteres son muy plásticos y poco diagnósticos.

En este trabajo, el análisis morfológico estuvo limitado por el tamaño de muestra y el estado físico de los ejemplares, ya que al ser donados por diversas instituciones fueron conservados en fijadores orgánicos o congelados, para ser posteriormente transportados al laboratorio. En el caso particular de los organismos provenientes del lago de Chapala son evidentes los errores humanos en dichos procedimientos, ya que los peces lucen maltratados en las dimensiones del cuerpo. Por ello, los datos de las mediciones morfológicas presentados no son válidos para efectuar análisis estadísticos como pruebas de significancia, ya que los estándares a seguir de manera rigurosa en cualquier estudio morfológico no fueron cumplidos. Aun así, los valores reportados en esta tesis fueron comparados para seleccionar

a los organismos que mejor se ajustan al morfotipo definido por Barbour (1973 *b*) para las especies de peces blancos, sin haber podido discriminar a nivel de especie a los individuos pertenecientes a cada una de las tres poblaciones analizadas.

Por último, al efectuar un análisis morfológico en el género *Chirostoma* debe contemplarse que: *a*) la discriminación de especies por medio de marcadores morfológicos puede considerarse de manera general como un método invasivo, ya que la medición de caracteres *in situ* resulta estresante para los organismos debido a la excesiva manipulación de los mismos fuera del agua (Strauss y Bond, 1990) y en el caso particular de los peces blancos, donde en limitadas ocasiones un carácter diagnóstico útil es el número de branquiespinas (Pérez-Ramírez, 2003), la cuantificación del mismo no puede efectuarse *in situ* o bien se realiza provocando daños al animal y elevando los índices de mortalidad, lo cual en programas de cultivo con fines de producción o conservación no es conveniente; *b*) existe la probabilidad de hibridación entre especies congéneres y *c*) se tiene necesidad de definir la variación de los caracteres morfológicos y su grado de heredabilidad por medio de estudios de genética cuantitativa.

CAPITULO II. DISCRIMINACION MOLECULAR

II.1 ANTECEDENTES

Los primeros trabajos de discriminación de especies de peces blancos empleando marcadores moleculares, fueron los de Rincón Calderón (1992) y Alaye-Rahy (1996 *a*) quienes por medio del polimorfismo de la hemoglobina identificaron especies del género *Chirostoma* en el Lago de Pátzcuaro, considerando que la expresión de las proteínas permanece constante a lo largo de todo el ciclo de vida. Ambas autoras reportaron un patrón electroforético con características cuantitativas (como número de bandas observadas en gel) y cualitativas (como intensidad de las bandas) para las especies *C. lucius* (nativa de Chapala), *C. estor*, *C. humboldtianum* y *C. grandocule*. En un trabajo posterior (Alaye-Rahy, 1996 *b*) mencionó la existencia de híbridos entre la especie introducida *C. lucius* y la nativa *C. estor*, además de otros híbridos cuyas formas parentales fueron difíciles de determinar.

De acuerdo con Liu y Cordes (2004), la identificación de especies requiere conocimiento previo, ya que es necesario determinar si las especies son puras o híbridas. En 2001, Barriga-Sosa presentó secuencias de dos genes mitocondriales: *r16S* y citocromo *b* para las cinco especies de peces blancos (recolectadas en los lagos de Pátzcuaro y Chapala), mismas que fueron discriminadas por medio de análisis morfológicos y moleculares, concluyendo que ambos marcadores moleculares pueden ser utilizados para inferir relaciones filogenéticas entre especies del género *Chirostoma* y otros géneros de atherinópsidos. Estos dos genes son altamente conservados y, en el caso particular del gen mitocondrial para el ARN *r16S*, la tasa promedio de sustitución inter específica (28.6%) resulta informativa para efectuar la discriminación de especies. De acuerdo con Palumbi (1996), los genes ribosomales mitocondriales presentan baja variación entre especies de un mismo género, razón por la cual han sido utilizados para estudios inter específicos en diferentes sistemas biológicos (Park y Moran, 1994; McGauley y Mulligan, 1995; Bossier *et al.*, 2004).

Pérez-Ramírez (2003) utilizó el análisis de fragmentos de restricción del gen mitocondrial *r16S* amplificado mediante PCR para discriminar a organismos con morfotipo de la especie

Chirostoma humboldtianum del Lago de Pátzcuaro de sus congéneres *C. estor* y *C. lucius*. Pérez-Ramírez y Barriga-Sosa (2003) sugirieron que el uso de genes mitocondriales permite discriminar particularmente a especies de peces blancos, siendo corroborado en un trabajo posterior (Barriga-Sosa *et al.*, 2005) el cual, incluye a las especies cultivadas *C. estor* (CRIP-INP) y *C. humboldtianum* (INIRENA-UMSNH) provenientes del Lago de Pátzcuaro. En éste último trabajo se concluyó que el método (análisis de fragmentos de restricción enzimática de genes mitocondriales) es útil para discriminar a las especies en estadios juvenil y adulto y además, en la práctica, puede ser una técnica no invasiva al extraer ADN a partir de una mínima cantidad de tejido branquial, el cual presenta una alta tasa de regeneración. Incluso, puede emplearse tejido de aleta (Dr. García de León, CIBNOR *com. per.*).

En este capítulo, 28 organismos del género *Chirostoma*, seleccionados previamente por morfología (ver Capítulo I), fueron sometidos al análisis de fragmentos de restricción del gen mitocondrial para el ARN *r16S*, con la finalidad de efectuar la discriminación a nivel de especie.

II.2 METODOLOGIA

II.2.1 Extracción de ADN total

La extracción de ADN total de los 28 organismos analizados (Tabla 1) se hizo a partir de tejido branquial, siguiendo el protocolo Dneasy Tissue Kit (Qiagen^{MR}), recuperando dos fracciones del mismo (Anexo 1A). El tejido branquial (aprox. 25 mg) se extirpó del lado derecho de cada uno de los organismos de estudio.

El ADN total extraído de las diferentes muestras fue observado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como amortiguador TAE (Tris-acetato 10 mM y EDTA 1 mM)(1x). Los geles se sometieron a 90 voltios (v) durante 60 minutos, para después ser teñidos con Bromuro de Etidio (EtBr, 0.1 mg/L). La calidad del ADN total de cada uno de los organismos, se observó al exponer los geles a luz ultravioleta (320 nm). Los geles fueron

fotodocumentados en un equipo Multi Genius de Syngene^{MR}, siendo capturados con el programa Gene Snap (versión 6.02.05).

II.2.2 Amplificación vía PCR y cuantificación del gen mitocondrial para el ARN r16S

Se empleó el Taq PCR Core Kit (Qiagen^{MR}) y su respectivo protocolo, con algunas modificaciones (Anexo 1B). Los iniciadores utilizados fueron los universales propuestos por Palumbi *et al.* (1991) para el gen mitocondrial para el ARN ribosomal 16S: r16Sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y r16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3').

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 μ L empleando el termociclador Tpersonal Biometra^{MR} con el siguiente programa: un ciclo de inicio que comprende la desnaturalización durante 1 minuto 30 segundos a 96 $^{\circ}$ C (separación doble cadena ADN), un minuto a 50.5 $^{\circ}$ C de fase de anillamiento (reconocimiento del iniciador) y la elongación durante 1 minuto 30 segundos a 72 $^{\circ}$ C; 30 ciclos con las mismas condiciones de temperatura pero durante 30, 45 y 30 segundos respectivamente. El ciclo final fue de 10 minutos a 72 $^{\circ}$ C como fase de extensión. El programa de PCR es el reportado por Mora-Souza (1998), Torres-Frías (1998) y Barriga-Sosa (2001) a excepción de la temperatura de anillamiento, la cual fue determinada en el presente trabajo.

Además de la obtención de productos amplificados de los 28 organismos en cuestión, fue sometido al mismo proceso de PCR ADN total extraído de organismos de las siguientes especies: *Chirostoma promelas* y *C. sphyraena* discriminados por Barriga Sosa (2001) y *C. estor* y *C. humboldtianum* discriminados por Barriga-Sosa *et al.* (2005), con la finalidad de utilizarlos como controles en el presente trabajo. El ADN total de los cuatro organismos arriba mencionados fue donado por los autores citados.

Los productos amplificados se observaron mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo el protocolo anteriormente descrito, siendo fotodocumentados a continuación. La cuantificación se realizó empleando el programa Gene Tools (versión

3.03.03) y los marcadores moleculares de peso conocido 100 pb DNA y 100 pb PCR (BIO-RAD^{MR}) como referencia.

II.2.3 Purificación y cuantificación de productos amplificados

La purificación se llevó a cabo empleando el sistema QIA quick (Qiagen^{MR}) (Anexo 1C). Los productos purificados también fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y fotodocumentados, bajo las condiciones antes mencionadas. La concentración en nanogramos (ng) de los productos purificados se determinó con base en el marcador molecular de peso conocido 100 pb DNA (BIO-RAD^{MR}) y el programa Gene Tools (versión 3.03.03).

II.2.4 Análisis de fragmentos de restricción

Selección de enzimas y análisis de fragmentos por simulación

La selección de las enzimas de restricción a utilizar para la discriminación de las especies de peces blancos se basó en la metodología de Pérez-Ramírez (2003) y Barriga-Sosa *et al.* (2005), la cual consiste en someter las secuencias obtenidas por Barriga-Sosa (2001) del gen mitocondrial para el ARN r16S de las cinco especies de peces blancos a una simulación en computadora por medio del programa NEB cutter^R (<http://rebase.neb.com/rebase/>), para ello, las secuencias fueron alineadas por medio del programa de computo *Multialin* (Corpet, 1988) (? 560-570 pb). Al efectuar la simulación y considerando la variación intra poblacional ausente, se obtuvieron el número y tamaño de fragmentos esperados con una enzima de restricción determinada; los resultados obtenidos en la simulación son teóricos, pues se basan en las secuencias obtenidas (? 560-570 pb) a partir de un fragmento amplificado, mientras que, las restricciones del presente trabajo se llevaron a cabo en productos amplificados de aproximadamente 620 pb, por lo que el tamaño de los fragmentos observados en gel puede ser mayor al esperado, en cambio el número de fragmentos es el mismo (Barriga-Sosa *et al.*, 2005).

Las enzimas utilizadas fueron en orden alfabético: *Aci* I *Arthrobacter citreus* (5'-C'CGC-3'), *Bce* AI *Bacillus cereus* (5'ACGGC(N)₁₂-3'/ 3'-TGCCG(N)₁₄-5'), *Bfa* I *Bacteroides fragilis* (5'-C'TAG-3'), *Bsa* AI *Bacillus stearothermophilus* (5'-Pi AC'GT Pu-3'), *Bsm* FI *Geobacillus stearothermophilus* (5'-GGGAC(N)₁₀-3'/ 3'-CCCTG(N)₁₄-5'), *Eag* I *Enterobacter agglomerans* (5'-C'GGCCG-3') y *Hpy*CH4 IV *Helicobacter pylori* CH4 (5'-A'CGT-3') (Tabla 5).

Digestión de productos amplificados mediante las enzimas seleccionadas

Las digestiones se llevaron a cabo en un microtubo de 0.6 mL, en el cual se colocó un volumen variado (¿L) del producto amplificado del gen mitocondrial para el ARN r16S purificado (¿ 620 pb) con concentraciones aproximadas a los 20 ng/2 ¿L; 1 a 3 unidades de enzima; 2.5 ¿L de amortiguador (Tris, cofactor y pH dependiendo de la enzima) y un volumen variable de agua destilada para completar un volumen final por reacción de 25 ¿L, la cual fue incubada a la temperatura y el tiempo sugerido por el proveedor (*Biolabs*^{MR}). La reacción se detuvo por incubación a 4°C.

La visualización de los fragmentos de restricción se hizo por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, colocándose 15 ¿L de la reacción de restricción y 5 ¿L del amortiguador de carga para restricción. El tamaño de los fragmentos de restricción generados, fue determinado por medio del programa Gene Tools (versión 3.03.03) y los marcadores moleculares de peso conocido: 20 pb DNA, 100 pb DNA y 50-2000 pb DNA (*BIO-RAD*^{MR}) como referencia. Las diferencias en el patrón de bandeo (número y/o tamaño de fragmentos) entre individuos se asumieron como diferencias genéticas (Nei y Kumar, 2000), diferencias que pueden discriminar por especie a los individuos analizados.

Tabla 5. Tamaños y número de fragmentos teóricos obtenidos a partir de simulaciones al usar siete enzimas de restricción en secuencias (560-570 pb) de cada una de las especies de peces blancos.

Enzima	<i>C. estor</i>	<i>C. humboldtianum</i>	<i>C. lucius</i>	<i>C. promelas</i>	<i>C. sphyraena</i>
<i>Aci</i> I	218	219	219	219	124
	127	127	127	126	119
	126	126	125	125	118
	47	50	48	49	94
	30	30	25	30	47
	11	11	11	11	30
	2	2	4	2	11
	2	2	2	2	2
<i>Bce</i> AI	299	303	301	302	294
	264	211	262	209	200
		53		53	53
<i>Bfa</i> I	365	365	363	448	435
	112	116	117	118	112
	86	86	86		
<i>Bsa</i> AI	NSR	481	554	555	NSR
		86	9	9	
<i>Bsm</i> FI	NSR	317	NSR	316	308
		250		248	239
<i>Eag</i> I	NSR	529	NSR	526	509
		38		38	38
<i>Hpy</i> CH4 IV	NSR	597	593	563	NSR
		10	13	13	

NSR= no sitio de restricción.

Es importante mencionar que cada población se trabajó de manera individual, razón por la cual, se empleó un gel por enzima de restricción. En dicho gel, se incluyó un purificado del producto amplificado del gen mitocondrial para el ARN r16S (? 620 pb) sin digerir con la finalidad de presentar mayor evidencia de los fragmentos generados por la enzima o, en su caso, la ausencia de ellos. Además, en algunos casos también se incluyeron controles de especies conocidas de peces blancos, esto es, restricciones de productos amplificados y purificados del gen mitocondrial para el ARN r16S.

Los resultados obtenidos para cada individuo analizado, fueron registrados en una base de datos haplotípica en la cual, se codificó con 0 (cero) la ausencia de un fragmento de restricción y con 1 (uno) la presencia de este en cada una de la enzimas ensayadas. Con estos datos, se elaboraron haplotipos compuestos (suma codificada de presencia/ausencia de fragmentos de restricción observados en la secuencia del gen mitocondrial para el ARN r16S). Cada población fue analizada de manera independiente.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Extracción de ADN total

Se obtuvo ADN total para 26 de los 28 organismos analizados, aunque se observó degradación en algunas muestras (Figura 4). Dos organismos de la población Chapala mostraron un ADN altamente degradado.

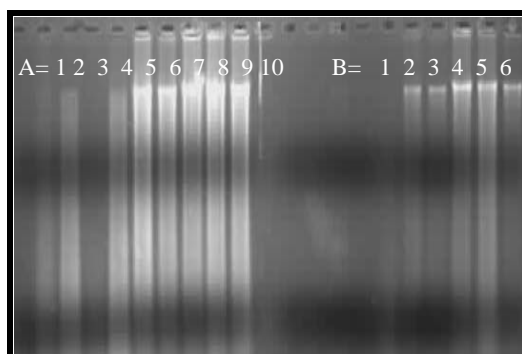


Figura 4. ADN total de los organismos provenientes del Centro Acuicola Tizapán.
A= primera fracción recuperada; B= segunda fracción recuperada.

II.3.2 Amplificación vía PCR y cuantificación del gen mitocondrial para el ARN r16S

Se obtuvieron productos amplificados del gen mitocondrial para el ARN r16S para 26 de los 28 organismos analizados, en los dos restantes (población Chapala), la amplificación vía PCR no tuvo éxito. El tamaño del fragmento amplificado en todos los organismos analizados coincidió con el esperado (aproximadamente 620 pb ± 10, de acuerdo al programa GeneTools^{MR}) (Figura 5). En cuanto a la amplificación de los cuatro organismos empleados como controles, la concentración de los productos fue muy baja para las especies *Chirostoma promelas* y *C. sphyraena*, mientras que para las especies *C. estor* y *C. humboldtianum* (discriminadas por Barriga-Sosa *et al.* en prensa), la concentración fue adecuada para efectuar las reacciones de restricción (Figura 6).

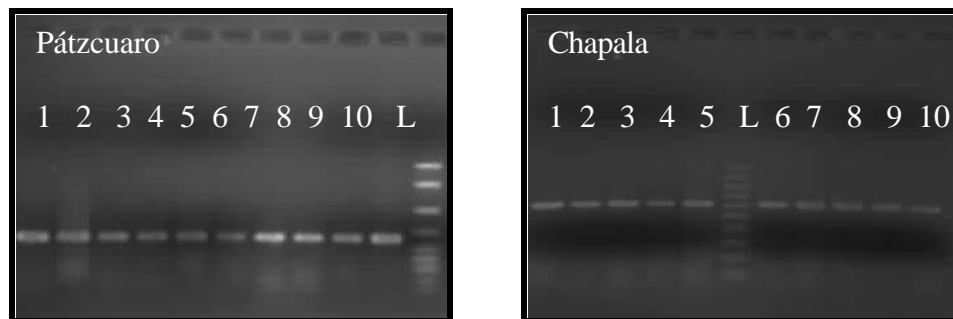


Figura 5. Amplificaciones del gen mitocondrial para el ARN r16S. L= marcador molecular 100 pb DNA (BIO-RAD^{MR}); 1-10= número de organismo de las respectivas poblaciones.

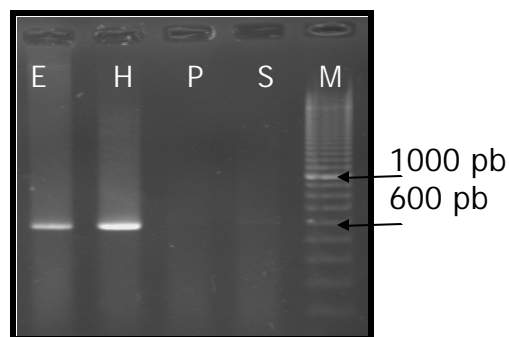


Figura 6. Amplificaciones control. E= *C. estor*; H= *C. humboldtianum*; P= *C. promelas*; S= *C. sphyraena*; M= marcador molecular 100 pb PCR (BIO-RAD^{MR}).

II.3.3 Purificación y cuantificación de productos amplificados

La purificación de productos amplificados permitió la eliminación de impurezas (residuos de enzima, dNTP's y MgCl₂, principalmente), obteniéndose con ello, bandas bien definidas (Figura 7). Al analizar los geles de cada población con el programa GeneTools^{MR}, se cuantificó la concentración del fragmento, oscilando ésta entre los 20-50 ng/ 2 µL.

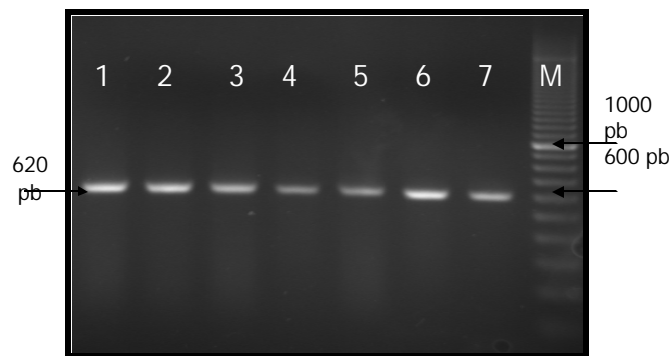


Figura 7. Productos de PCR purificados del gen mitocondrial para el ARN r16S. M= marcador molecular 100 pb PCR (BIO-RAD^{MR}); 1-7= número de organismo; población Tizapán.

II.3.4 Análisis de fragmentos de restricción

Los patrones de restricción enzimática observados en cada individuo se presentan a continuación por población. Cabe mencionar, que debido a la pérdida de resolución al usar agarosa, los fragmentos menores a 50 pb no fueron considerados en el análisis de haplotipos compuestos.

Población Pátzcuaro

La Tabla 5, en donde se muestran los fragmentos esperados mediante el análisis de simulación fue utilizada como referencia para construir la Tabla 6, la cual contiene los fragmentos observados en los geles de agarosa analizados en este estudio (Anexo 2A).

Cada uno de los diez organismos analizados en este estudio presentaron el haplotipo compuesto esperado para la especie *Chirostoma estor* (000 00 00) con las enzimas de restricción *Bsa* AI, *Eag* I y *Hpy*CH4 IV (Tabla 6 y Anexo 2A).

Tabla 6. Haplotipos compuestos esperados y observados para los individuos de la población Pátzcuaro.

	<i>Bsa</i> AI			<i>Eag</i> I		<i>Hpy</i>CH4 IV	
	554-555	481	86	526-529	509	593-597	563
Especie							
<i>C. estor</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. humboldtianum</i>	0	1	1	1	0	1	0
<i>C. lucius</i>	1	0	0	0	0	1	0
<i>C. promelas</i>	1	0	0	1	0	0	1
<i>C. sphyraena</i>	0	0	0	0	1	0	0
Organismos							
1-10*	0	0	0	0	0	0	0

*= El tamaño de los fragmentos observados con cada enzima fue determinado a partir de los geles de agarosa (Anexo 2A).

Población Chapala

Sólo fueron analizados 6 individuos de los 8 previamente seleccionados porque, como ya se comentó anteriormente, dos de ellos mostraron un ADN altamente degradado que impidió que se amplificara exitosamente el fragmento *r16S*. Los seis organismos analizados mostraron el mismo haplotipo compuesto (011 000 11 00), el cual corresponde con el esperado para la especie *C. sphyraena* (Tabla 5) con las enzimas de restricción *Aci* I, *Bsa* AI, *Bsm* FI y *Hpy*CH4 IV (Tabla 7 y Anexo 2B).

Tabla 7. Haplotipos compuestos esperados y observados para la población de Chapala.

	Aci I			Bsa AI			Bsm FI		HpyCH4 IV	
	219	125-126	118-119	554-555	481	86	308-317	239-250	593-597	563
Especie										
<i>C. estor</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. humboldtianum</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
<i>C. lucius</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>C. promelas</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>C. sphyraena</i>	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Organismos										
1-6*	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0

*= El tamaño de los fragmentos observados con cada enzima fue determinado a partir de los geles de agarosa (Anexo 2B).

Población Tizapán

Los organismos de Tizapán mostraron un patrón de haplotipos compuestos difícil de interpretar con la información disponible debido a: 1) la posibilidad de una variación intraespecífica hasta ahora no considerada y 2) el método de visualización de los fragmentos de restricción de cada enzima valorada. De acuerdo al arreglo de las bandas esperadas (Tabla 5) con lo observado en los geles (Anexo 2C), los individuos analizados mostraron dos haplotipos compuestos diferentes en esta población, estos haplotipos muestran similitudes entre los haplotipos esperados para las especies *C. estor* (enzimas *Bfa I*, *Bsa AI*, *Eag I* y *HpyCH 4IV*) y *C. humboldtianum* (enzimas *Bce AI* y *Bfa I*); pero además con la enzima *Bsm FI*, existen diferencias entre el grupo 1-5, los cuales se asemejan al haplotipo esperado de *C. estor* y *C. lucius* (00) y el grupo 6-10, que presentaron el haplotipo esperado para las especies *C. humboldtianum*, *C. promelas* y *C. sphyraena*.

	Bce AI				Bfa I				Bsa I			Bsm FI		Eag I		HpyCH 4IV	
	294-303	262-264	200-211	53	435-448	363-365	112-118	86	554-555	481	86	308-317	239-250	526-529	509	593-597	563
Especie																	
<i>C. estor</i>	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. humboldtianum</i>	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
<i>C. lucius</i>	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>C. promelas</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
<i>C. sphyraena</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Organismos																	
1-5*	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-10*	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0

IV. DISCUSION

En este trabajo fue validado el método de discriminación de especies de peces blancos propuesto por Pérez-Ramírez (2003) y Barriga-Sosa *et al.* (2005), pudiéndose discriminar a los organismos de las poblaciones Pátzcuaro ($n= 10$) y Chapala ($n= 6$), mientras que la población de Tizapán presentó haplotipos compuestos difíciles de interpretar. En otros grupos de peces, tanto marinos como dulceacuícolas, la discriminación de especies por medio del análisis de fragmentos de restricción ha resultado de gran utilidad y suele efectuarse sin mayores complicaciones (Barlett y Davidson, 1991; Seyoum y Kornfield, 1992; Tagliavini *et al.*, 1995; Hold *et al.*, 2001; McDowell y Graves, 2002) pero, dada la problemática particular del género *Chirostoma* el uso de ADN mitocondrial para efectuar la discriminación entre especies debe considerarse como una aproximación, relacionándose con la historia de manejo de las diferentes poblaciones analizadas. A continuación, se discuten por separado los resultados obtenidos.

a) *Población Pátzcuaro.* Comparando los haplotipos compuestos esperados con los observados (Tabla 6), los diez individuos analizados fueron discriminados como *Chirostoma estor*. Debe considerarse que existe evidencia de hibridación natural entre *C. estor* y *C. grandocule* (Pérez-Velázquez, 1987) en el lago de Pátzcuaro y, dado que el ADN mitocondrial es principalmente heredado por vía materna (Avise, 1994; 2000) y no se tienen datos sobre patrones de variación genética para el gen *r16S* en el charal *C. grandocule*, se tiene la desventaja de no poder identificar y evaluar la posible existencia de híbridos sin datos adicionales de un marcador nuclear, situación que se complica en los organismos con amplia variación morfológica (ver Capítulo I).

b) *Población Chapala.* De origen silvestre, los haplotipos compuestos observados permitieron discriminar a los individuos como *Chirostoma sphyraena* (Tabla 7), especie que ha sido reportada en ese embalse junto con *C. estor*, *C. lucius* y *C. promelas* (Moncayo Estrada *et al.*, 2003). En el análisis de esta población se encontraron como limitantes del método de discriminación molecular: 1) la pérdida de resolución por el uso de agarosa y 2) la ausencia de controles (restricción enzimática de productos amplificados del gen mitocondrial *r16S*) tanto para especies de peces blancos como de charales.

c) *Población Tizapán*. De las tres poblaciones analizadas, la proveniente del Centro Acuícola Tizapán es la única bajo manejo antropogénico evidenciado y también la única cuyos integrantes no pudieron ser discriminados a nivel de especie. Las causas de ello podrían ser las siguientes: 1) las limitaciones del método arriba mencionadas, las cuales, generaron incertidumbre en la determinación de algunos haplotipos compuestos; 2) la variación genética intra específica, aunque no fue observada en poblaciones cultivadas de las especies *Chirostoma estor* ($n= 40$) y *C. humboldtianum* ($n= 50$) (Barriga-Sosa *et al.*, 2005) y que se asume que el gen mitocondrial para el ARN r16S es una secuencia conservada; existe evidencia de variación intra poblacional en el pez *Micropterus salmoides* (Rodríguez Martínez, 2004) y en otros grupos animales (Bond *et al.*, 2001) y 3) la hibridación entre especies congéneres dentro del género *Chirostoma*, ya que existe evidencia experimental (Andrade Tinoco, 1990; Ledesma, 1990; Estrada, 1991) y natural (Pérez-Velázquez, 1987) de la misma en el lago de Pátzcuaro; además se han reportado numerosos casos de hibridación entre diferentes especies congéneres de peces, sugiriéndose que los mecanismos de aislamiento natural pueden alterarse como resultado del manejo antropogénico (Skibinski, 1998).

Por lo que respecta al método, se tienen como principales ventajas: 1) el requerir una pequeña cantidad de tejido recolectado *in situ* o conservado mediante diversos medios (Tagliavini *et al.*, 1995; Takeyama *et al.*, 2001; Gusmão y Solé-Cava, 2002; Barriga-Sosa *et al.* en prensa) y 2) en grupos de peces con importancia pesquera, el método ha sido aplicado a productos procesados (Hold *et al.*, 2001; Sebastio *et al.*, 2001) con fines de regulación. Dentro de las limitaciones del análisis de fragmentos de restricción, se encuentran: 1) la resolución, ya que las deleciones e inserciones en una secuencia determinada de ADN, que impliquen la ganancia o pérdida de un sitio de restricción aunque son fáciles de detectar por electroforesis en agarosa (Liu y Cordes, 2004), en ocasiones los fragmentos de restricción son muy pequeños (< 50 pb) y el usar agarosa complica su observación (Hold *et al.*, 2001). Una alternativa para solucionar esta limitante es el empleo de poliacrilamida en lugar de agarosa y 2) la inversión de tiempo y dinero. De tal modo, la discriminación de especies por medio del análisis de fragmentos de

restricción tiene amplia aplicación en el campo de la conservación (Yan *et al.*, 2005) y la producción (Gusmão y Solé-Cava, 2002) de diversos sistemas biológicos, aunque debe considerarse que el empleo de éste método puede ser útil para algunas especies pero menos relevante para otras (Bossier *et al.*, 2004) dependiendo del gen a usar y su tasa de mutación así como de los métodos empleados para revelar ese polimorfismo. Además, debe considerarse la historia de vida y el *status* de los organismos (Avice *et al.*, 1986; Billington y Hebert, 1988; Liu y Cordes, 2004).

En el caso particular del género *Chirostoma*, este tipo de metodología podría ser una alternativa inmediata en cuestiones de manejo (Barriga-Sosa *et al.*, 2005), siempre y cuando la variación intra específica sea determinada, ya que haría factible la discriminación de especies y el manejo de las mismas en granjas de cultivo o inclusive en los propios embalses, tal como se contempló con el salmón (Skibinski, 1998). El inconveniente a considerar es la probabilidad de hibridación de las especies de interés, ya que como se mencionó el uso independiente de un marcador mitocondrial no resolverá el problema de la discriminación de híbridos, razón por la cual serán necesarios nuevos estudios enfocados a evaluar la capacidad de hibridación entre especies de peces blancos así como sus posibles combinaciones (*p. ej.*, determinar si los híbridos pueden reproducirse a su vez con las especies parentales). Por otro lado, debe contemplarse la necesidad de ampliar la perspectiva del análisis molecular, empleando genes nucleares e incluyendo a todas las especies del género *Chirostoma*, con la finalidad de efectuar la discriminación con mayor certidumbre.

Finalmente, los resultados expuestos deben ser considerados como evidencia de la problemática existente tanto en la discriminación de especies como en el manejo acuícola del género *Chirostoma*; manejo que conlleva a limitaciones en el método propuesto en este capítulo.

CAPITULO III. VARIACION GENETICA

III.1 ANTECEDENTES

En el manejo y conservación de especies el conocimiento genético juega un papel fundamental, ya que entre otras cosas permite: 1) determinar la variación genética, 2) evidenciar diferenciación genética entre taxa y 3) inferir relaciones filogenéticas entre poblaciones geográficamente aisladas (Caro y Laurenson, 1994; O'Brien, 1994). El estudio de la variación genética es de gran importancia, ya que está relacionado con el crecimiento de una población y con la capacidad de respuesta de la misma ante cambios ambientales (Leberg, 1990).

En peces blancos, uno de los primeros trabajos de variación genética fue el de Echelle y Echelle (1984), en el cual se analizaron 15 de las 18 especies del género *Chirostoma* por medio de aloenzimas, presentándose datos generales de polimorfismo ($P_{0.95} = 13.6$) y heterocigosidad esperada ($He = 0.042$). Los autores concluyeron que ambos valores pueden considerarse bajos, pero dentro de los observados para otros grupos de peces.

Barriga-Sosa (2001) efectuó un análisis de variación genética de 13 especies y 3 subespecies del género. Fueron ensayados 17 sistemas, detectándose nueve *loci* polimórficos, diez monomórficos y cuatro sin actividad, siendo el valor promedio de heterocigosidad esperada para todas las especies en estudio ligeramente mayor ($He = 0.063$) al reportado por Echelle y Echelle (1984). De acuerdo con la autora, la discrepancia en los valores de He pudo deberse a que los sistemas aloenzimáticos estudiados en ambos trabajos no fueron los mismos. Los valores de heterocigosidad esperada promedio en las especies de peces blancos fueron: *Chirostoma humboldtianum* (0.085), *C. estor* (0.083), *C. promelas* (0.073), *C. sphyraena* (0.070) y *C. lucius* (0.042).

En 2002, Barriga-Sosa *et al.*, analizaron las cinco especies de peces blancos y algunas poblaciones de éstas, empleando 23 *loci* aloenzimáticos. Los autores determinaron que algunas especies presentan cambios en los valores de variación genética con respecto a los

reportados por Echelle y Echelle (1984), por ejemplo *Chirostoma humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* y *C. sphyraena* muestran un incremento en variación genética; además, se observó diferenciación genética entre las poblaciones de *C. estor* y *C. lucius* provenientes de los lagos de Chapala y Pátzcuaro, la cual fue argumentada como resultado del aislamiento geográfico. Así mismo, se reportó una desviación en el equilibrio de Hardy-Weinberg, sustentado tanto por el tamaño de muestra como por el déficit de heterocigotos en algunas de las poblaciones estudiadas. En estos últimos trabajos (Barriga-Sosa, 2001; Barriga-Sosa et al., 2002), se propuso la necesidad de emplear un marcador molecular que presentara variación a nivel inter e intra específico y un método no invasivo para tipificar genéticamente a las especies que conforman el género y, a futuro, comprender los procesos que promueven la divergencia entre las mismas.

Para inferir relaciones filogenéticas entre *Poblana* y *Chirostoma*, Ruíz Castillo (2003) analizó secuencias de la región control mitocondrial de tres especies de *Poblana* y ocho de *Chirostoma* (*C. attenuatum attenuatum*, *C. a. zirahuen*, *C. estor*, *C. grandocule*, *C. humboldtianum*, *C. jordani*, *C. patzcuaro* y *C. rioja*). La diversidad nucleotídica reportada para *Chirostoma* sp. (1 ó 2 organismos por especie) fue de 0.215.

Por lo anterior, en este trabajo se analizaron secuencias obtenidas de un fragmento de la región control mitocondrial (? 300 nucleótidos) con la finalidad de proveer información sobre la variación genética existente dentro y entre las especies *Chirostoma estor* y *C. humboldtianum*, así como para determinar posibles diferencias entre poblaciones silvestres y cultivadas. Además, se determinó y comparó la diversidad genética en *Chirostoma* y *Poblana*.

III.2 METODOLOGIA

III.2.1 Selección de organismos analizados

Se analizaron 39 organismos de *Chirostoma* y siete de *Poblana* (Pisces: Atherinopsidae). Para determinar la variación genética inter específica (en *Chirostoma* sp., *C. estor* y *C. humboldtianum*) e intra específica (en *C. estor*) y entre poblaciones silvestres y cultivadas, los organismos analizados fueron donados por diferentes instituciones (Tabla 9). Por medio del análisis de fragmentos de restricción del gen mitocondrial para el ARN r16S, los organismos provenientes del CRIP-INP y del INIRENA-UMSNH fueron discriminados a nivel de especie por Pérez-Ramírez (2003) y Barriga-Sosa *et al.* (2005) mientras que, los provenientes del lago de Pátzcuaro y del Centro Acuícola Tizapán fueron discriminados en este trabajo (Capítulo II).

Tabla 9. Procedencia de organismos analizados del género *Chirostoma*.

Especie	Procedencia	Ubicación	Muestra	Año	<i>n</i>
<i>Chirostoma</i> sp.	C. A. Tizapán	Jalisco	Cultivada	2004	10
<i>C. estor</i>	CRIP- INP	Pátzcuaro, Mich.	cultivada	2002	10
<i>C. humboldtianum</i>	INIRENA-UMSNH	Morelia, Mich.	cultivada	2002	10
<i>C. estor</i>	Lago de Pátzcuaro	Michoacán	silvestre	2003	10

n= tamaño de muestra. C.A. Tizapán= Centro Acuícola Tizapán; CRIP-INP= Centro de Investigación Pesquera Pátzcuaro-Instituto Nacional de la Pesca; INIRENA-UMSNH= Instituto de Investigación en Recursos Naturales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Los organismos del género *Poblana*, fueron donados de la Colección Nacional de Ictiología de la UNAM por el M. en C. Héctor Espinosa. Las especies, sitios y fechas de colecta, se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Relación de procedencia de los organismos analizados del género *Poblana*.

Especie	Localidad	Año de recolecta	<i>n</i>
<i>P. alchichica alchichica</i>	Alchichica, Puebla	2004	2
<i>P. alchichica letholepis</i>	La Preciosa, Puebla	2004	1
<i>P. alchichica squamata</i>	Quechulac, Puebla	2004	2
<i>P. ferdebueni</i>	Chignahuapan, Pue.	2004	2

n= numero de organismos

III.2.2 Extracción de ADN total y diseño de iniciadores de la región control mitocondrial

La extracción se realizó empleando el Dneasy Tissue Kit (Qiagen^{MR}) (Anexo 1A) como se describe en el Capítulo II.

Los iniciadores de la región control mitocondrial se diseñaron de manera específica para el género *Chirostoma* a partir de una secuencia de dicha región obtenida por medio de dos estrategias metodológicas:

1) Realizando más de 40 pruebas experimentales de amplificación vía PCR con los iniciadores universales de la región control mitocondrial (del extremo 5' tARN^{pro} a la región central conservada) L16007; H00651 y L15926 (Kocher *et al.*, 1989) y H16498 (Meyer *et al.*, 1990) (Anexo 1B) siendo el tamaño esperado del producto amplificado aproximado a las 480 pb. Esta estrategia no funcionó ya que los fragmentos amplificados fueron inespecíficos (Anexo 2D).

2) Analizando secuencias de la región control mitocondrial presentadas por Ruíz Castillo (2003) para siete especies del género del género *Chirostoma*. Estas secuencias fueron comparadas con secuencias registradas en el GenBank por medio de BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para corroborar que son fragmentos de la región control mitocondrial. Posteriormente, se alinearon en el programa *Multialin* (Corpet, 1988) y se analizaron en el software *Primer 3* (Rozen y Skalesky, 1998) para

determinar las secuencias de los iniciadores así como la longitud, las temperaturas medias (T_m) y la formación de estructuras secundarias. Los iniciadores diseñados fueron:

DloopR1 5'-AACCCCCACGATTGCTGTCC-3' (40% A-T, 60% G-C) $T_m = 70^\circ\text{C}$

DloopF 5'-CTAACTCCCAAAGCTAGGATT-3' (57% A-T, 43% G-C) $T_m = 58^\circ\text{C}$

III.2.3 Amplificación vía PCR y cuantificación de la región control mitocondrial

Las amplificaciones se realizaron siguiendo el protocolo del Taq PCR Core Kit (Qiagen^{MR}), con modificaciones (Anexo 1B) y los iniciadores específicos diseñados con una concentración inicial de 10^{-6}M . El programa empleado fue: 96°C de desnaturalización inicial durante dos minutos; 30 ciclos de 96°C durante 45 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos. La observación de productos amplificados se efectuó en geles de agarosa, como se describe en el Capítulo II.

III.2.4 Purificación y cuantificación de productos amplificados

La purificación de los productos amplificados se llevó a cabo con el sistema QIA quick (Qiagen^{MR}) y el protocolo sugerido por el proveedor (Anexo 1C). El tamaño y la concentración se determinaron a partir de un gel de agarosa al 1%, empleando el programa Gene Tools (versión 3.03.03) y el marcador molecular de peso conocido 100 pb PCR (BIO-RAD^{MR}) como referencia. Además, se evaluó la calidad de los productos amplificados empleando el *BioPhotometer* (fotómetro) de Eppendorf^{MR}, considerando las lecturas de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{320} nm. Valores entre 1.7-1.9 y cero respectivamente, fueron considerados como indicadores de calidad idónea.

III.2.5 Secuenciación automática

La secuencia de nucleótidos del fragmento de la región control mitocondrial amplificado (tamaño ? 380 pb; concentración ? 20-30 ng/2?L) se determinó de manera directa (automática), utilizando el método y el kit de ABI PRISM^{MR} BigDye terminator V.3.1 y los iniciadores originales de amplificación (concentración 5 pM). Las reacciones de secuenciación (Anexo 1D) fueron purificadas en columnas de Shepadex^{MR} G-50 y posteriormente fueron sometidas a electroforesis en el secuenciador ABI PRISM^{MR} 3100 Genetic Analyzer en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Los resultados obtenidos se analizaron a partir de los electroferogramas generados y el programa Chromas Lite 2.0 (www.technelysium.com.au).

III.2.6 Análisis de resultados

Para estimar y comparar la diversidad nucleotídica entre las secuencias de la región control mitocondrial de *Chirostoma* sp. y *Poblana* sp., se efectuó un análisis global incluyendo a los organismos pertenecientes a cada género (39 y 7 respectivamente). La variación genética de *Chirostoma* a nivel inter específico (*C. estor*, *C. humboldtianum* y *C. sp.*) e intra específico (*C. estor* silvestre Pátzcuaro y *C. estor* cultivada CRIP-INP) se determinó por medio de la diversidad nucleotídica, de acuerdo con Tajima (1983) y Nei (1987). La estructura genética se investigó por medio del análisis de varianza molecular (AMOVA) y los índices de fijación F_{CT} , F_{SC} y F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) fueron calculados después de efectuar 1000 permutaciones en la matriz de datos original (la cual se construyó considerando a cada género como un grupo independiente. Dentro de cada grupo, las especies que lo conforman: 3 de *Chirostoma* y 4 de *Poblana* jerarquizadas a nivel de población). Un segundo AMOVA se efectuó para determinar la estructura genética de las tres especies de *Chirostoma* analizadas, también se calculó el índice de fijación F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984). Valores de F cercanos a cero indican homogeneidad genética, mientras que valores cercanos a uno indican diferenciación, la significancia fue determinada con $\alpha = 0.05$. Todos los estimadores se calcularon en el programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2000).

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Extracción de ADN total y amplificación de la región control mitocondrial

Los resultados de extracción de ADN total se muestran en la Figura 4 (Capítulo II).

Con los iniciadores y el programa de PCR diseñados, se obtuvieron productos amplificados para 46 de 47 organismos analizados; el amplificado faltante correspondió a un individuo de la especie *Chirostoma estor* del lago de Pátzcuaro. El tamaño del fragmento amplificado fue de aproximadamente 350 pb (Figura 8).

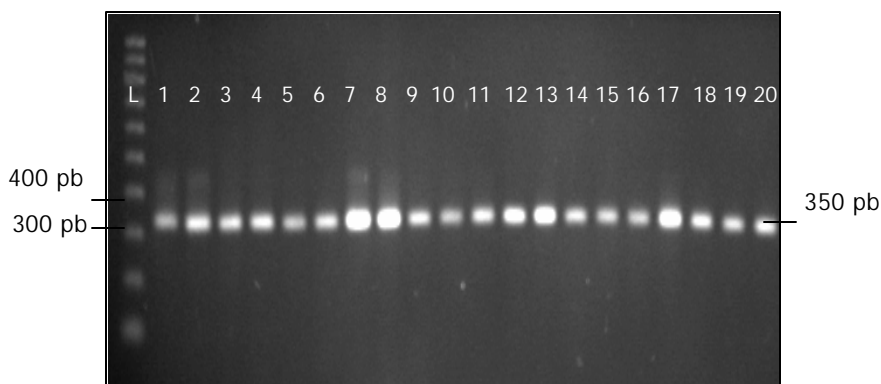


Figura 8. Amplificaciones de la región control mitocondrial. L= marcador molecular 100 pb DNA (BIO-RAD^{MR}); 1-20= número de organismo

III.3.2 Purificación y cuantificación de productos amplificados

La concentración y calidad de los 46 productos purificados fueron las requeridas para realizar la reacción de secuenciación. Los valores registrados para cada una de las cuatro poblaciones analizadas se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Intervalos de concentración y calidad de los productos purificados. Promedio entre paréntesis.

Especie Población	Concentración ng /2 ?L	Calidad	
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₃₂₀
<i>Chirostoma</i> sp. Tizapán	17-27 (22.85)	1.6-2.08 (1.84)	0.01
<i>C. estor</i> Pátzcuaro	40-49 (45.5)	1.37-1.82 (1.76)	0.00
<i>C. estor</i> CRIP-P	40-80 (51.5)	1.58-1.74 (1.66)	0.00
<i>C. humboldtianum</i> INIRENA	26-36 (27.3)	1.6-1.89 (1.73)	0.03
<i>Poblana</i> sp.	37-60 (54.0)	1.55-1.76 (1.63)	0.00

A= absorbancia

III.3.3 Análisis de secuencias

Se obtuvieron 46 secuencias con un tamaño de 301 nucleótidos en *Chirostoma* y 316 nucleótidos en *Poblana*. Las 39 secuencias obtenidas para las especies de *Chirostoma* se presentan en el Anexo 2E. El análisis BLAST (Altschul *et al.*, 1997) efectuado para las secuencias del género *Chirostoma* con las depositadas en el banco de genes del NCBI, mostró similitud con *Atherinosoma elongata* (58%) (número de acceso AY313135) y *Leptaterina wallacei* (56%) (número de acceso AY326711), ambas especies pertenecientes a la familia Atherinidae (Pisces: Atheriniformes).

Diversidad genética entre *Chirostoma* y *Poblana*

El análisis global de las 39 secuencias de las especies de *Chirostoma* indicó la presencia de 30 haplotipos diferentes; de los 301 nucleótidos analizados, 69 fueron polimórficos y la diversidad nucleotídica estimada fue de 0.037. En las especies del género *Poblana*, se presentaron siete haplotipos diferentes; de 316 nucleótidos analizados, 25 fueron sitios polimórficos y el valor de diversidad nucleotídica fue de 0.035. El número de sustituciones fue mayor en *Chirostoma* (60), por 23 en *Poblana*.

La composición porcentual de bases nitrogenadas en las secuencias de las especies del género *Chirostoma* fue: adeninas (A) 37.18, citosinas (C) 18.96, guaninas (G) 14.52 y timinas (T) 29.34; mientras que en *Poblana* sp.: A= 34.00, C= 20.55, G= 16.03 y T= 29.43. Como se esperaba, el número de transiciones fue mayor que el de las transversiones: en *Chirostoma* se presentaron 43 y 17 y en *Poblana* 16 y 7, respectivamente.

Diversidad genética entre especies de *Chirostoma*

Los índices de diversidad genética obtenidos para cada especie del género *Chirostoma* se presentan en la Tabla 12. El valor más alto de diversidad nucleotídica correspondió a la especie *Chirostoma* sp. (proveniente del Centro Acuícola Tizapán) con 0.046, mientras que las especies *C. humboldtianum* y *C. estor* mostraron el mismo valor, aún cuando *C. estor* presentó mayor número de sitios polimórficos.

Tabla 12. Índices de diversidad genética en los peces blancos objeto de estudio. Individuos analizados por población entre paréntesis.

Especie	NH	NP	NTR	NTV	NS	DN
<i>Chirostoma</i> sp. (10)	9	36	22	8	30	0.046
<i>C. estor</i> Pátzcuaro (19)	17	41	30	8	38	0.028
<i>C. humboldtianum</i> (10)	7	29	14	7	21	0.028

NH= número de haplotipos observados; NP= número de sitios polimórficos; NTR= número de transiciones; NTV= número de transversiones; NS= número de sustituciones; DN= diversidad nucleotídica.

Diversidad genética entre poblaciones de *Chirostoma estor*

La diversidad nucleotídica en la población nativa del lago de Pátzcuaro, fue prácticamente dos veces mayor a la encontrada en la población cultivada proveniente del CRIP-INP. Los valores fueron 0.039 y 0.016 respectivamente. Como puede observarse, *C. estor* cultivada presentó menor diversidad genética comparada con las especies *Chirostoma* sp. y *C. humboldtianum* también cultivadas (Tabla 12).

Análisis de estructura poblacional

Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA), efectuado para determinar la estructuración genética de los grupos analizados (*Chirostoma* –vs- *Poblana*), mostraron que la mayor variación se presenta entre grupos (94.63%); el índice de fijación calculado ($F_{CT} = 0.95$) fue significativo ($P? 0.000$).

Dentro de los grupos, existe mayor variación al interior de las poblaciones que entre ellas (Tabla 13). Los índices de fijación para determinar la diferenciación genética entre poblaciones dentro de los grupos ($F_{SC} = 0.18$, $P? 0.000$) y la diferenciación dentro de las poblaciones ($F_{ST} = 0.95$, $P? 0.000$) fueron significativos (se emplearon 1023 permutaciones).

Tabla 13. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de *Chirostoma* y *Poblana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Indices de fijación	Porcentaje de variación
Entre grupos (<i>Chirostoma</i> –vs- <i>Poblana</i>)	1216.68	101.79	$F_{CT} = 0.95$	94.63
Entre poblaciones dentro de grupos	58.31	1.02	$F_{SC} = 0.18$	0.95
Dentro de las poblaciones	185.26	4.75	$F_{ST} = 0.95$	4.42
Total	1460.25	107.56		

En cuanto al análisis de varianza molecular realizado en *Chirostoma* sp., *C. estor* y *C. humboldtianum* el 78.10% de la variación se encontró al interior de las poblaciones (Tabla 14). El valor de F_{ST} fue 0.22 ($P? 0.000$), indicando que existe diferenciación genética entre las especies.

Tabla 14. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de las especies de *Chirostoma*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	42.48	1.34	21.90
Dentro de las poblaciones	171.80	4.77	78.10
Total	214.28	6.11	

IV. DISCUSION

El presente estudio demostró que el análisis de secuencias de la región control mitocondrial es una herramienta para monitorear la diversidad genética dentro y entre especies de peces blancos del género *Chirostoma*, así como para efectuar análisis de estructura genética como se ha reportado para otros grupos de peces (Martin *et al.*, 1992; Jones y Quattro, 1993; Hansen y Loeschcke, 1996; Guarniero *et al.*, 2002).

Diversidad genética entre *Chirostoma* y *Poblana*

En el análisis global efectuado, los valores de diversidad nucleotídica estimados en las especies de *Chirostoma* ($n= 39$) y *Poblana* ($n= 7$) fueron similares (0.037 y 0.035 respectivamente), aún cuando el número de sitios polimórficos observados fue mayor en el primer género. Estos valores, contrastaron con los reportados por Ruíz Castillo (2003). Al respecto, debe considerarse que las diferencias pueden ser causa de: 1) la composición de especies objeto de análisis; 2) el número de organismos analizados (*Chirostoma*: 15 en Ruíz Castillo, 2003 –vs- 39 en el presente estudio; *Poblana*: 49 en Ruíz Castillo, 2003 –vs- 7 en el presente estudio); 3) el número total de nucleótidos analizados (538 en el estudio de 2003 –vs- 301 en este trabajo); 4) el estimador empleado en cada trabajo y 5) los efectos del muestreo, el cual en este trabajo estuvo limitado por el bajo número de organismos analizados.

Fueron detectados 69 sitios polimórficos en *Chirostoma* y 25 en *Poblana*, al analizar 301 nucleótidos mientras que, en otros peces como *Poecilia reticulata*, se reportaron 30 sitios en 363 pb (Fajen y Breden, 1992) y en ciclidos africanos, 15 sitios en 350 pb (Meyer *et al.*, 1990).

La región control presentó mayor contenido de A+T en comparación con G+C, 66.53 % y 63.43 % en *Chirostoma* y *Poblana*, respectivamente. Resultados similares han sido descritos en otros peces como *Mugil cephalus* (Rocha-Olivares *et al.*, 2005). Por lo que respecta a los cambios de bases nitrogenadas, se observaron más transiciones que transversiones, como se ha reportado en el pez arcoiris *Melanotaenia splendida* (Zhu *et al.*, 1994) y también en primates (Tagliaro *et al.*, 1997). Los valores de diversidad nucleotídica encontrados, de manera general, pueden considerarse como intermedios entre otros grupos de peces. Por ejemplo, en salmónidos la variación en la región control fue baja o nula (Hall y Nawrocki, 1995; O'Connell *et al.*, 1995; Hansen y Loeschcke, 1996) mientras que en lenguados, la variación nucleotídica observada permitió detectar la subdivisión de poblaciones (Guarniero *et al.*, 2002).

Diversidad genética entre especies de *Chirostoma*

En las tres especies de *Chirostoma*, las secuencias de la región control analizadas exhibieron variación (Tabla 12). La diversidad nucleotídica más alta correspondió a *Chirostoma* sp., seguida por las especies *C. humboldtianum* y *C. estor* que presentaron el mismo valor (0.028). En 2001, Barriga-Sosa al analizar con aloenzimas cuatro poblaciones de *C. humboldtianum* y dos de *C. estor* (82 organismos en total), reportó resultados similares siendo la heterocigosidad esperada (*He*) promedio ligeramente mayor en la primera especie con respecto a la segunda.

En el caso particular de *Chirostoma* sp., proveniente del Centro Acuícola Tizapán, se observó mayor variación en los fragmentos de restricción del gen mitocondrial *r16S*, a diferencia de las otras especies discriminadas (ver Capítulo II). La diversidad nucleotídica reportada podría estar relacionada con el manejo de los organismos, ya que se sugiere la mezcla de

poblaciones de diferentes orígenes y/o manipulaciones en la conformación del stock analizado, situación que en peces suele acompañar la transición de estado silvestre a cultivado (Chevassus y Dorson, 1990).

Diversidad genética entre poblaciones de *Chirostoma estor*

La población de *C. estor* nativa del lago de Pátzcuaro presentó mayor diversidad nucleotídica (0.039) comparada con la población cultivada en el CRIP-INP (0.016). En peces, diversos trabajos (Agnese *et al.*, 1997; Iguchi *et al.*, 1999; McGlashan y Hughes 2001; Romana-Eguia *et al.*, 2004) comparan la diversidad genética entre poblaciones silvestres y cultivadas, obteniendo resultados similares a los reportados en este estudio.

La diversidad nucleotídica en *Chirostoma estor* silvestre fue similar a la encontrada en *Poblana* sp. (0.035), aún cuando las especies de peces blancos han estado expuestas a la sobrepesca y a la introducción de especies exóticas, factores que suelen provocar pérdida de la diversidad genética en poblaciones silvestres (Krueger *et al.*, 1981; Ferguson, 1990; García-Marín *et al.*, 1991; Ward y Grewe, 1995; Einum y Fleming, 1997).

Por otra parte, el valor de diversidad nucleotídica reportado en este trabajo para la población de *C. estor* del CRIP-INP, fue menor comparado con las especies *Chirostoma* sp. y *C. humboldtianum*, si se considera que las tres especies provienen de cultivos (Tablas 9 y 12). La baja diversidad podría relacionarse con el número de organismos que integran el stock reproductivo o bien con la posible consanguinidad de los mismos (M. en C. Soto-Aguirre, INP *com. per.*)

Análisis de estructura genética

Echelle y Echelle (1984) y Coyote (2000) con base en los resultados obtenidos en análisis moleculares (empleando aloenzimas y RAPDs, respectivamente), postularon que los géneros *Chirostoma* y *Poblana* podrían ser considerados como una sola entidad. En el análisis de varianza molecular efectuado en este trabajo se consideró como grupos a los dos géneros, la

mayor variación genética se presentó entre los mismos (94.73%), y el valor de F_{CT} fue cercano a la unidad y altamente significativo ($F_{CT} = 0.95$; $P? 0.000$). Estos resultados permiten suponer que prácticamente no hay flujo genético entre ellos, favoreciendo la idea de dos entidades biológicas completamente diferentes.

En *Chirostoma* y *Poblana*, el índice de fijación calculado entre poblaciones dentro de cada grupo sugiere que también existe diferenciación genética entre las especies que conforman cada género ($F_{SC} = 0.18$; $P? 0.000$). Al realizar un análisis de AMOVA en las especies de *Chirostoma*, se constata que esa diferenciación es debida a que el 78.10% de la variación genética se presentó al interior de las poblaciones ($F_{ST} = 0.22$, $P? 0.000$), indicando que prácticamente todos los haplotipos de los diversos individuos estudiados fueron diferentes entre sí. También es notoria la existencia de diferenciación genética entre *Chirostoma* sp., *C. estor* y *C. humboldtianum*, resultados similares en especies provenientes de diferentes embalses han sido reportados por Ward *et al.* (1994) utilizando aloenzimas. En *Chirostoma*, la diferenciación genética en poblaciones de *C. estor* y *C. lucius* fue evidenciada por medio de análisis aloenzimáticos (Barriga-Sosa *et al.*, 2002) al igual que en otros peces dulceacuícolas como *Odontesthes argentinensis* (Atherinopsidae) (Beheregaray y Levy, 2000), *Cyprinodon rubrofluviatilis* (Atheriniformes) (Ashbaugh *et al.*, 1994), *Plecoglossus altivelis* (Iguchi *et al.*, 1999) y cíclidos nicaragüenses (Wilson *et al.*, 2000) en estos dos últimos trabajos, por medio de secuencias de la región control mitocondrial.

De acuerdo con Iguchi *et al.* (1999), los valores de variación genética determinados a partir de secuencias de la región control en peces dulceacuícolas pueden estar subestimados por el bajo tamaño de muestra ($n = 10$), razón por la cual se recomienda ampliar tanto el número de organismos como el número de marcadores moleculares analizados en estudios próximos.

Por último, debe considerarse que cualquier programa de manejo de peces genera posibles consecuencias genéticas (Ferguson *et al.*, 1995; Skibinski, 1998), por lo que se recomienda que: los marcadores genéticos sean desarrollados para monitorear a los peces; la manipulación genética sea la mínima y los sistemas de cruce o apareamiento sean diseñados

y controlados para no disminuir el tamaño mínimo de las poblaciones, minimizando con ello la pérdida de variación genética.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Discriminación morfológica

I) De esta parte de la tesis se puede concluir que los once caracteres morfológicos registrados fueron informativos para discriminar a los peces blancos de los charales.

II) Los 28 organismos analizados presentaron el morfotipo de los peces blancos de acuerdo con Barbour (1973 *b*) aunque no pudieron ser discriminados a nivel de especie debido a tres causas: *a*) el estado físico en el que se encuentran algunos de ellos como resultado del método de conservación, lo cual pudo provocar cambios en las dimensiones naturales del cuerpo; *b*) el alto traslape de caracteres morfológicos entre las cinco especies de peces blancos y *c*) el bajo tamaño de muestra.

III) La variación morfológica existente en el género *Chirostoma*, el manejo inadecuado que ha sufrido en los últimos años y la probabilidad de hibridación entre especies congéneres, son las principales limitantes en el uso de las claves de identificación de especies propuestas por Barbour (1973 *b*). Lo anterior ocasiona que las claves y descripciones morfológicas elaboradas hace más de treinta años sean obsoletas, por lo que se requiere actualizarlas.

Se recomienda efectuar un análisis morfológico extenso que considere:

- i. Estudios de genética cuantitativa para determinar los factores causales de la variación morfológica y su grado de heredabilidad.
- ii. Sistemas experimentales de hibridación que permitan tipificar a los organismos híbridos y determinar por ejemplo, si esos híbridos tienen la capacidad de reproducirse con las especies parentales.

Discriminación molecular

I) Con el análisis de fragmentos de restricción del gen mitocondrial para el ARN ribosomal 16S se discriminó a los 28 morfotipos seleccionados previamente por medio de caracteres morfológicos como *Chirostoma estor* (población silvestre del lago de Pátzcuaro) y *C. sphyraena* (población silvestre del lago de Chapala).

II) Los organismos donados por el Centro Acuícola Tizapán no pudieron ser discriminados a nivel de especie debido a que presentaron un patrón de haplotipos compuestos difícil de discernir. Las posibles causas de ello son: a) limitaciones del método, b) variación intra específica y c) hibridación.

III) El método de discriminación molecular requiere una pequeña cantidad de tejido branquial (recolectada *in situ* o conservada por diversos medios) y puede ser considerado relativamente práctico dada la inversión de tiempo y dinero.

Debido a la posibilidad de hibridación entre especies del género *Chirostoma*, se recomienda:

- i. Ampliar la perspectiva del análisis molecular, considerando a todas las especies que integran el género y empleando marcadores nucleares como los microsátélites.
- ii. Realizar estudios que permitan evaluar a los posibles híbridos.
- iii. Controlar los sistemas de cruce o apareamiento así como regular el manejo acuícola de los organismos.

Variación genética

I) Las secuencias de la región control mitocondrial en las especies de *Chirostoma* (301 nucleótidos) y *Poblana* (316 nucleótidos) mostraron alta variación ya que de 46 haplotipos analizados, 37 fueron diferentes.

II) Por lo que respecta a la diversidad nucleotídica, los valores reportados en ambos géneros fueron similares (*Chirostoma* = 0.37 y *Poblana* = 0.35). De las tres especies de *Chirostoma* analizadas, la mayor diversidad nucleotídica correspondió a *C. sp.* (0.046) mientras que *C. estor* y *C. humboldtianum* presentaron la misma diversidad (0.028). En la especie *Chirostoma estor* se observó mayor diversidad nucleotídica en la población silvestre (0.039) con respecto a la cultivada (0.016).

III) En *Chirostoma* y *Poblana* el valor de F_{CT} (0.95; $P < 0.000$) apoya la idea de que son dos unidades biológicas diferentes. En las especies de *Chirostoma*, los valores de F_{SC} (0.18; $P < 0.000$) y F_{ST} (0.22; $P < 0.000$) sugieren diferenciación genética, lo cual puede ser resultado de la variación genética al interior de cada especie (78.10%) y/o al aislamiento geográfico.

Por lo anterior se recomienda:

- i. Emplear el análisis de secuencias de la región control mitocondrial para monitorear la diversidad genética dentro y entre especies de peces blancos, tanto silvestres como sometidas a manejo acuícola.
- ii. En poblaciones cultivadas, diseñar sistemas de cruce o apareamiento con la finalidad de no disminuir el tamaño efectivo de las poblaciones y evitar las mezclas de poblaciones y/o especies.
- iii. Analizar otros marcadores moleculares para evaluar la diferenciación genética.

VII. REFERENCIAS

- Adachi, J., Y. Cao y M. Hasegawa, 1993. Tempo and mode of mitochondrial DNA evolution in vertebrates at the amino acid sequence level: rapid evolution in warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.* 36: 270-281.
- Agnese, J. F., B. Adepo-Gourene, E. K. Abban e Y. Fermon, 1997. Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei Cichlidae). *Heredity* 79: 88-96.
- Alaye-Rahy, N., 1993. El pescado blanco (género *Chirostoma*) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Composición de especies. *Ciencia Pesquera* 9: 113-128.
- Alaye-Rahy, N., 1996 a. Estudios del polimorfismo de la hemoglobina para identificar especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Ciencia Pesquera* 13: 1-9.
- Alaye-Rahy, N., 1996 b. Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro Michoacán, México. *Ciencia Pesquera* 13: 1-17.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter, 2002. *Molecular biology of the cell*. 4^a. ed. Garland Science, Nueva York. 767-821 p.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Alvarez, del Villar J., 1963. Ictiología mexicana III. Los peces de San Juanico y de Tocombo, Mich. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Mex.* 12: 111-138.

-
-
- Alvarez del Villar, J., 1970. *Peces mexicanos*. Secretaría de Industria y Comercio, México. p.120-128.
- Alvarez del Villar, J., 1972. Algunos ejemplos de especiación en peces mexicanos. *Ciencia* 13: 81-89.
- Andrade Tinoco, E., 1990. Desarrollo embrionario y larval de *Chirostoma patzcuaro* Meek 1902 y de los híbridos obtenidos por fecundación artificial con *Chirostoma grandocule* Steindachner 1894 (Pisces: Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. UMSNH. 88 p.
- Ankel-Simons, F. y J. M. Cummins, 1996. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13859-13863.
- Arriaga Haro, V. M., M. Guzmán Arroyo y M. G. Morelos López, 1995. Hábitos alimenticios. En: M. Guzmán Arroyo (comp.). *La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional* Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional del Agua, México. p. 119-141.
- Ashbaugh, N. A., A. A. Echelle y A. F. Echelle, 1994. Genic diversity in Red River pupfish *Cyprinodon rubrofluviatilis* (Atheriniformes: Cyprinodontidae) and its implications for the conservation genetics of the species. *J. Fish Biol.* 45: 291-302.
- Avise, J. C., G. S. Helfman, N. C. Saunders y L. S. Hales, 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of a unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4350-4354.
- Avise, J. C., 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, Nueva York. 511 p.

-
-
- Avise, J. C., 2000. *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge. 447 p.
- Barbour, C. D., 1973 a. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A species flock from the Mexican Plateau. *Copeia* 3: 533-556.
- Barbour, C. D., 1973 b. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma*, Swainson. *Tul. Stud. Zool. Bot.* 19: 97-141.
- Barbour, C. D. y B. Chernoff, 1984. Comparative morphology and morphometric of the pescados blancos (Genus *Chirostoma*) from the lake Chapala, México. *En: A. A. Echelle e I. Konfield (eds.). Evolution of fish species flocks*. University of Maine Press, Toronto. p. 11-126.
- Bartlett, S. E. y W. S. Davidson, 1991. Identification of *Thunnus* Tuna species by the Polymerase Chain Reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome *b* genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 309-317.
- Barriga Sosa, I. D. L. A., 2001. Variabilidad morfométrica, merística y molecular de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae). Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. UAM Iztapalapa. 199 p.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., A. L. Ibañez-Aguirre y J. L. Arredondo-Figueroa, 2002. Morphological and genetic variation of seven species of the endangered *Chirostoma "humboldtianum" species group* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Rev. Biol. Trop.* 50: 199-216.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., L. E. Eguiarte y J. L. Arredondo-Figueroa, 2004. Low but significant subdivisión among populations of *Chirostoma grandocule* from lake Patzcuaro, Mexico. *Biotropica* 36: 85-98.

-
-
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., M. Y. Pérez-Ramírez, F. Soto-Aguirre, M. Castillo-Rivera y J. L. Arredondo-Figueroa, 2005. Inter-specific variation of the mitochondrial r16S gene among silversides "Peces Blancos" (Atherinopsidae: Menidiinae) and its utilization for species identification. *Aquaculture* 250: 637-651.
- Beheregaray, L. B. y J. A. Levy, 2000. Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei: Atherinopsidae): evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. *Copeia* (2): 441-447.
- Berlanga-Robles, C. A., A. Ruíz Luna, M. R. Nepita Villanueva y J. Madrid Vera, 1997. Estabilidad y diversidad de la composición de peces del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Rev. Biol. Trop.* 45 (4): 1553-1558.
- Berlanga-Robles, C. A., J. Madrid-Vera y A. Ruíz-Luna, 2002. Fish abundante and trophic structure from the comercial match in Lake Patzcuaro, Mexico. *Hydrobiologia* 467: 117-122.
- Bernal-Brooks, F. W., A. Gómez-Tagle y J. Alcocer, 2002. Lake Patzcuaro (Mexico): a controversy about the ecosystem water regime approached by field references, climatic variables, and GIS. *Hydrobiologia* 467: 187-197.
- Billington, N. y P. D. N. Hebert, 1988. Mitochondrial DNA variation in Great Lakes Walleye (*Stizostedion vitreum*) populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 643-654.
- Blancas Arroyo, G. A., G. Figueroa Lucero, I. D. L. A. Barriga Sosa y J. L. Arredondo Figueroa, 2003. Aportaciones al cultivo del pez blanco, *Chirostoma humboldtianum*. (Pisces: Atherinopsidae). En: P. M. Rojas y D. Fuentes (eds.). *Historia y avances del Cultivo de Pescado Blanco*. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA, México. p. 155-168.

-
-
- Bond, J. E., M. C. Hedin, M. G. Ramírez y B. D. Opells. 2001. Deep molecular divergence in the absence of morphological and ecological change in the Californian coastal dune endemic trapdoor spider *Aptostichu simus*. *Mol. Ecol.* 10: 899-910.
- Bossier, P., W. Xiaomei, F. Catania, S. Doms, G. Van Stappen, E. Naessens y P. Sorgeloos, 2004. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia* spp. (international study on *Artemia* LXX). *Aquaculture* 231: 93-112.
- Boulenger, G. A., 1900. Description of two Atherinoid fishes from Mexico. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 7 (5): 54-55.
- Brown, W. M., M. George y A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.
- Calvo Gómez, F., 1993. *Técnicas estadísticas multivariantes*. Universidad de Deusto, Bilbao. 444 p.
- Cárdenas Reygadas, R., 2003. Cultivo del pez blanco *Chirostoma humboldtianum*. Consideraciones para su producción. En: P. M. Rojas y D. Fuentes (eds.). *Historia y avances del Cultivo de Pescado Blanco*. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA, México. p. 191-209.
- Caro, T. M. y M. K. Laurenson, 1994. Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science* 263: 485-486.
- Carta Nacional Pesquera, 2004. SAGARPA-INP, México. 29 de marzo de 2004.
- Cilia, V., B. Lafay y R. Christen, 1996. Sequence heterogenities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analysis at the species level. *Mol. Biol. Evol.* 13 (3): 451-461.

-
-
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16: 10881-10890.
- Coyote, B. A., 2000. Análisis de las relaciones taxonómicas entre las especies de *Poblana De Buen* (Pisces: Atherinopsidae) mediante marcadores RAPD. Tesis Licenciatura. ENCB-IPN, México. 91 p.
- Cuadras, C. M., 1991. *Métodos de análisis multivariante*. Promociones y Publicaciones Universitarias, Barcelona, 319 p.
- Cha, R. S. y W. G. Thilly, 1995. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. En: C. W. Dieffenbach y G. S. Dveksler (eds.). *PCR primer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. p. 37-51
- Chacón Torres, A., 1993. *Pátzcuaro un lago amenazado*. Bosquejo limnológico. UMSNH, México. 144 p.
- Chacón-Torres, A., M. R. Pérez y I. E. Muzquiz, 1991. *Síntesis Limnológica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México*. Biol. Acuát. I, Sría. de Difusión Cultural Edit. Univ., México. 48 p.
- Chacón-Torres, A. y C. Rosas-Monge, 1995. A restoration plan for pez blanco in Lake Pátzcuaro, México. *Am. Fish. Soc. Symp.* 15: 122-126.
- Chevassus, B. y M. Dorson, 1990. Genetics of Resistance to Disease in Fishes. *Aquaculture* 85: 83-107.
- Dawid, I. B., 1972. Evolution of mitochondrial DNA sequences in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 29: 139-151.

-
-
- De Buen, F., 1940 a. Pescado blanco, chacuami y charari del lago de Pátzcuaro. Trabajos de la estación limnológica de Pátzcuaro, Mich. Sría. de Ind. y Com. Dir. Gral. de Pesca e Indus. *Conex 1*: 1-24.
- De Buen, F., 1940 b. Huevos, crías, larvas y jóvenes de *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro. Trabajos de la estación limnológica de Pátzcuaro, Mich. Sría. de Ind. y Com. Dir. Gral. de Pesca e Indus. *Conex 3*: 1-14.
- De Buen, F., 1945. Investigaciones sobre Ictiología Mexicana. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 5: 435-531.
- Degroot, M. H., 1988. *Probabilidad y Estadística*. Addison-Wesley Iberoamericana, México. 694 p.
- Dowling, T. E., C. Moritz y J. D. Palmer, 1990. Nucleic Acids II: Restriction Site Analysis. En: D. M. Hills, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Publishers, Massachusetts. p. 250-317.
- Dyer, B. S. y B. Chernoff, 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei : Atherinomorpha). *Zool. J. Linn. Soc.* 117: 1-69.
- Echelle, A. A. y A. F. Echelle, 1984. Evolutionary genetics of a "species flock": Atherinid fishes of the Mesa Central Mexico. En: A.A. Echelle e I. Konfield (eds.). *Evolution of fish species flocks*. University of Maine Press, Toronto. p. 93-110.
- Einum, S. e I. A. Fleming, 1997. Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 50: 634-651.
- Estrada, R. M. C., 1991. Verificación a nivel experimental de los híbridos entre *Chirostoma estor* y *Chirostoma grandocule* (Pisces: Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis Licenciatura. UMSNH. 113 p.

-
-
- Faber, J. E. y C. A. Stepien, 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. En: T. D. Kocher y C. A. Stepien (eds.). *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, San Diego. p. 129-143.
- Fajen, A. y F. Breden, 1992. Mitochondrial DNA sequence variation among natural populations of the Trinidad guppy, *Poecilia reticulata*. *Evolution* 46 (5): 1457-1465.
- Ferguson, A., J. B. Taggart, P. A. Prodöhl, O. McMeel, C. Thompson, C. Stone, P. McGinnity y R. A. Hynes, 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Biol.* 47 (supl. A): 103- 126.
- Ferguson, M. M., 1990. The genetic impact of introduced fishes on native species. *Can. J. Zool.* 68: 1053-1057.
- Ferguson, M. M. y R. G. Danzmann, 1987. Deviation from morphological intermediacy in interstrain hybrids of rainbow trout *Salmo gairderi*. *Environ. Biol. Fishes* 18: 249-256.
- Ferguson, M. M. y R. G. Danzmann, 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1553-1563.
- Filonov, A. E., 1998. ¿Morirá el lago de Chapala? Existe la posibilidad de salvarlo. *Teorema* 3: 16-18.
- Filonov, A. E., 2002. On the dynamical response of Lake of Chapala, México to lake breeze forcing. *Hydrobiologia* 467: 141-157.
- García de León, F. J., 1984. Relaciones alimenticias y reproductivas entre *Chirostoma estor* Jordan y *Micropterus salmoides* Lacepede, en el Lago de Pátzcuaro, Mich. Octavo Congreso Nacional de Zoología. Coahuila, México. 41-59 p.

-
-
- García de León, F. J., 2001. Los marcadores genéticos en el conocimiento y manejo de recursos bióticos. *BIOTAM* 12: 57-80.
- García-Marín, J. L., P. E. Jorde, N. Ryman, F. Utter y C. Plá, 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* 95: 235-249.
- Gómez-Tagle, A., F. W. Bernal-Brooks y J. Alcocer, 2002. Sensitivity of Mexican water bodies to regional climatic change: three study alternatives applied to remote sensed data of Lake Patzcuaro. *Hydrobiologia* 467: 169-176.
- González Díaz, A. A., 2000. Osteología comparada del aparato branquial en especies del género *Chirostoma* Swainson (Pisces: Atherinopsidae). Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México. 86 p.
- Guarniero, I., S. Franzellitti, N. Ungaro, S. Tommasini, C. Piccinetti y F. Tinti, 2002. Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. *J. Fish Biol.* 60: 1459-1474.
- Gusmão, J. y A. M. Solé-Cava, 2002. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. p. 754-764.
- Guzmán Arroyo M. y E. Merino Nambo, 1995. El lago de Chapala. En: M. Guzmán Arroyo (comp.). *La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional* Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional del Agua, México. p. 29-48.

-
-
- Guzmán Arroyo M. y J. M. Ortiz Martínez, 1995. Distribución espacial. *En*: M. Guzmán Arroyo (comp.). *La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional* Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional del Agua, México. p. 73-91.
- Guzmán Arroyo, M., S. Galaviz Solís y M. G. Morelos López, 1995. Ciclos reproductivos. *En*: M. Guzmán Arroyo (comp.). *La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional* Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional del Agua, México. p. 93-117.
- Hair, J. F., R. E. Anderson, R. L. Tatham y W. C. Black, 1992. *Multivariate data analysis with readings*. 3^a ed. Macmillan Publishing, EUA. 544 p.
- Hall, H. J. y L. W. Nawrocki, 1995. A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish Biol.* 46: 360-364.
- Hansen, M. M. y V. Loeschcke, 1996. Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *J. Fish Biol.* 48: 422-436.
- Hillis, D. M., B. K. Mable, A. Larson, S. K. Davis y E. A. Zimmer, 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and cloning. *En*: D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Publishers, Massachusetts. p. 321-339.
- Hold, G. L., V. J. Rusell, S. E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, R. Vidal, M. Rey-Mendez, C. G. Sotelo, R. I. Pérez-Martin, A. T. Santos y C. Rosa, 2001. Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J. Agri. Food Chem.* 49: 1175-1179.
- INEGI, 1988. *Los municipios de Michoacán*. Secretaría de Gobernación, México.

-
-
- Ibañez Aguirre A. L. y J. Leonart, 1996. Relative growth and comparative morphometrics of *Mugil cephalus* L. y *M. curema* V. in the Gulf of Mexico. *Sci. Mar.* 60 (2-3): 361-368.
- Iguchi, K., K. Watanabe y M. Nishida, 1999. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. *Aquaculture* 178: 235-243.
- Jimenez-Badillo, M. L. y A. Gracia, 1995. Evaluación de la pesquería multiespecífica de charales (*Chirostoma* spp., Pisces, Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. *An. Inst. Biol. UNAM, Ser. Zool.* 66: 205-231.
- Jones, W. J. y J. M. Quattro, 1993. Genetic structure of summer flounder (*Paralichthys dentatus*) populations north and south of Cape Hatteras. *Mar. Biol.* 133: 129-135.
- Jordan, D. S., 1879. Notes on a collection of fishes obtained in the streams of Guanajuato and Chapala Lake, Mexico by Prof. A. Duges. *Proc. US Nat. Mus.* (2) : 298-301.
- Jordan, D. S. y J. O. Snyder, 1899. Notes on a collection of fishes from the rivers of Mexico, with description of twenty new species. *Bull. US Fish Comm.* 19: 115-147.
- Jordan, D. S. y B. W. Evermann, 1900. The fishes of north and middle America. *Bull. US Nat. Mus.* 47: 1-3136.
- Jordan, D. S. y C. L. Hubbs, 1919. Studies in ichthyology. A monographic review of the family Atherinidae or silversides. *L. Stanford Junior University Publications. University Series* 40: 1-87.
- Kidd, K. K. y G. Ruano, 1995. Optimizing PCR. *En: M. J. McPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor. PCR. A practical Approach.* OIRL Press at Oxford University Press. Oxford. p. 1-22.

-
-
- Kocher, T. D., W. K. Thomas y A. Meyer, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.
- Kornfield, I. y A. Parker, 1997. Molecular systematics of rapidly evolving species flock: The mbuna of Lake Malawi and the search for phylogenetic signal. *En: T. D. Kocher y C. A. Stepien (eds.). Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, San Diego. p.25-37.
- Krueger, C. C., A. J. Gharrett, T. R. Dehring y F. W. Allendorf, 1981. Genetic aspects of fisheries rehabilitation programs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1877-1881.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller y D. R. M. Passino, 1990. *Ictiología*. AGT Editor, México. 489 p.
- Landgraf A. y H. Wolfes, 1993. *Taq* polymerase (EC 2.7.7.7) with particular emphasis on its use in PCR protocols. *En: M. M. Burrell (ed.). Methods in Molecular Biology*, vol. 16: *Enzymes of molecular biology*. Humana Press, Totowa, N.J. p. 31-58.
- Leberg, P. L., 1990. Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. *J. Fish Biol.* 37: 193-195
- Ledesma, A. P. C., 1990. Análisis de las fases ontogénicas primarias y reconocimiento del híbrido obtenido por fecundación artificial entre *Chirostoma attenuatum* y *Chirostoma patzcuaro* (Pisces: Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis Licenciatura. UMSNH. 91 p.
- Lind, O. T. y L. O. Dávalos-Lind, 2002. Interaction of water quantity with water quality: the lake Chapala example. *Hydrobiologia* 467: 159-167.

-
-
- López, L. L., 1991. Peces y moluscos en el libro undécimo del Código Florentino. *En*: O. J. Polanco (comp.). *La fauna del Templo Mayor*. Asociación Amigos del Templo Mayor, INAH, García y Valadés Editores. p. 211-248.
- Liu, Z. J. y J. F. Cordes, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Martín del Campo, R., 1955. Productos biológicos del Valle de México. *Rev. Mex. Est. Antropol.* 14: 53-57.
- Martin, A. P., G. J. P. Naylor y S. R. Palumbi, 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357: 153-155.
- McDoweell, J. R. y J. E. Graves, 2002. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. *Fish. Bull.* 100: 537-544.
- McGauley, K. y T. J. Mulligan, 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial rRNA genes from yellowtail rockfish. *J. Fish Biol.* 47: 744-747.
- McGlashan, D. J. y M. Hughes, 2001. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Dividing Range. *J. Fish Biol.* 59: 55-67.
- Meek, E., 1902. A contribution to the Ichthyology of Mexico. *Field Collection of the Chicago Museum. Zoological Series* 3 (6): 63-118.
- Meyer, A., T. D. Kocher, P. Basasibwaki y A. C. Wilson, 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347: 320-322.

-
-
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *En: P. W. Hochachka y T. P. Mommsen (eds.). Biochemistry and molecular biology of fishes. Molecular biology frontiers* (vol. 2). Elsevier Science Publishers, Netherlands. p. 1-38.
- Miller, R. R., 1966. Quaternary freshwater fishes of North America. *En: H. E. Wright y D. G. Frez (eds.). The Quaternary of the United States*. Princeton University Press, Princeton. p. 569-579.
- Miller, R. R. y B. Chernoff, 1979. What is *Menidia*? *Ann. Mtg. American Soc. of Ichthyologists and Herpetologists*, University of Maine, Toronto.
- Miller, R. R. y M. L. Smith, 1986. Origin and geography of the fishes of Central Mexico. *En: C. H. Hocutt y E. O. Wiley (eds.). Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley and Sons, New York. p. 487-517.
- Milton, J. S. y J. O. Tsokos, 1989. *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. Interamericana, España. 527 p.
- Mitton, J. B., 1994. Molecular approaches to population biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 45-69.
- Moncayo Estrada, R., C. Escalera Gallardo y V. Segura García, 2003. Los pescados blancos del Lago de Chapala. Características generales. *En: P. M. Rojas y D. Fuentes (eds.). Historia y avances del Cultivo de Pescado Blanco*. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA, México. p. 51-77.
- Mora-Souza, P. I., 1998. Estudio merístico, morfométrico y molecular de ocho especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Informe Final de Servicio Social. UAM Xochimilco. 52 p.

-
-
- Morelos, M. G. y M. Guzmán Arroyo, 1995. Ictiofauna del lago. *En: M. Guzmán Arroyo (comp.). La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional* Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional del Agua, México. p. 49-71.
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, Nueva York. 512 p.
- Nei, M. y S. D. Kumar, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Nueva York. 333 p.
- NOM-059-SEMARNAT-2001. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 6 de marzo de 2001.
- O'Brien, S. J., 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5748-5755.
- O'Connell, M., D. O. F. Skibinski y J. A. Beardmore, 1995. Absence of restriction site variation in the mitochondrial ND5 and ND6 genes of Atlantic salmon amplified by the polymerase chain reaction. *J. Fish Biol.* 47: 910-913.
- O'Hara, S. L., F. A. Street-Perrott y T. P. Burton, 1993. Accelerated soil erosion around a Mexican highland lake caused by prehispanic agriculture. *Nature* 362: 48-51.
- Page, R. D. M. y E. C. Holmes, 1998. *Molecular Evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford. 346 p.
- Palumbi, S. R., 1996. Nucleic Acids II: The chain reaction. *En: D. M. Hills, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). Molecular Systematics*. Sinauer Associates Publishers, Massachusetts. p. 205-247.

-
-
- Palumbi S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice y G. Grabowski, 1991. *The simple fool's guide to PCR*. University of Hawaii, Honolulu. 34 p.
- Park, L. K. y P. Moran, 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4: 272-299.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. Booton y P. A. Fuerst, 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79 (2): 361-382.
- Paulo-Maya, J. P., G. Figueroa-Lucero y M. Soria-Barreto, 2000. Peces Dulceacuícolas Mexicanos. XIX *Chirostoma estor* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zoología Informa* (43): 59-74.
- Pepin, P. y S. M. Carr, 1993. Morphological, meristic, and genetic analysis of stock structure in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Newfoundland shelf. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1924-1933.
- Pérez-Ramírez, M. Y., 2003. Discriminación de *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinopsidae) del Lago de Pátzcuaro por medio de caracteres morfológicos, aloenzimáticos y PCR-RFLP's del gen mitocondrial 16S. Informe Final de Servicio Social. UAM Iztapalapa. 54 p.
- Pérez-Ramírez, M. Y. e I. D. L. A. Barriga-Sosa, 2003. Aplicación de PCR-RFLP's del gen mitocondrial 16S para identificar a *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinopsidae) del lago de Pátzcuaro. Memorias de la I Reunión Nacional de Atherinópsidos. México, D.F. p. 45.
- Pérez-Velázquez, H. 1987. Contribución al conocimiento de la hibridación natural entre *Chirostoma estor* Jordan 1879 y *C. grandocule* Steindachner 1894 (Pisces: Atherinidae) en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. UMSNH. 48 p.

Qiagen^{MR}, 2002. QIA quick^{MR} Spin Handbook. Valencia, California. 34 p.

Qiagen^{MR}, 2002. Dneasy^{MR} Tissue Handbook. Valencia, California. 43 p.

Qiagen^{MR}, 2002. Taq PCR Handbook. Valencia, California. 38 p.

Rincón Calderón, M. C., 1992. Estudio de polimorfismo de hemoglobina para la identificación de las especies del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis Licenciatura. UMSNH. 95 p.

Rocha-Olivares, A., N. M. Garber, A. F. Garber y K. C. Stuck, 2005. Structure of the mitochondrial control region and flanking tRNA genes of *Mugil cephalus*. *Hidrobiológica* 15:139-149.

Rodríguez Martínez, R. I. 2004. Diversidad genética evaluada mediante marcadores mitocondriales y nucleares en las poblaciones de *Micropterus salmoides* en el Noreste de México. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria.

Rodríguez-Ruíz, A. y C. Granado-Lorencio, 1988. Características del aparato bucal asociadas al régimen alimenticio en cinco especies coexistentes del género *Chirostoma* (Lago de Chapala, México). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 61: 35-51.

Rojas Carrillo, P. M. y L. F. Sasso Yada, 2005. "El Pescado Blanco". Revista Digital Universitaria ¿en línea?. 10 de agosto de 2005. Vol.6, N° 8.
¿Consultada: 11 de agosto de 2005?. Disponible en Internet: ¿http: www.revista.unam.mx/vol6/num8/art80/into80.htm? ISSN: 1607-6079.

Romana-Eguía, M. R., M. Ikeda, Z. U. Basaio y N. Taniguchi, 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236: 131-150.

-
-
- Rosas, M., 1970. *Pescado blanco (Chirostoma estor) su fomento y cultivo en México*. Sría. de Ind. y Com. Dir. Gral. de Pesca e Ind. Conex. Inst. Nal. de Inv. Biol. Pesq. México. 80 p.
- Rozen, S. y M. J. Skalesky, 1998. *Primer 3* code available to http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3
- Ruíz Castillo, E. A., 2003. Relaciones taxonómicas entre las especies de Poblana De Buen (Pisces: Atherinopsidae) mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas de un fragmento de la región control del DNA mitocondrial (mtDNA). Tesis Licenciatura, ENCB-IPN. 87 p.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich y N. Arnheim, 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stottel, S. Scharf, S. J. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier, 2000. Arlequin versión 2.000: A software for population genetics data análisis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Genova, Switzerland.
- Sebastio, P., P. Zanelli y T. M. Neri, 2001. Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. *J. Agri. Food Chem*, 49: 1194-1199.

-
-
- Seyoum, S. e I. Kornfield, 1992. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Aquaculture* 102: 29-42.
- Skibinski, D. O. F., 1998. Genetical aspects of fisheries enhancement. En: T. Petr (ed.). *Inplant fishery enhancements*. FAO Fisheries Technical Paper, 374. FAO, Roma. p. 205-222.
- Sokal R. R. y F. J. Rohlf, 1981. *Biometry*. 2ª ed. Freeman, San Francisco.
- Solórzano, P. A. y Y. López, 1965. Nueva especie de *Chirostoma* capturada en la laguna Victoria o de Santiago Tilapa, Estado de México (Pisces: Atherinidae). *Ciencia* 24 (2-3): 145-150.
- Soria-Barreto, M., J. Paulo-Maya, A. Chacón-Torres y V. Segura-García, 1998. Peces Dulceacuícolas Mexicanos. XVI *Chirostoma estor* (Atheriniformes: Atherinidae). *Zoología Informa* (38): 33-46.
- Soria-Barreto, M. y J. Paulo-Maya, 2005. Morfometría comparada del aparato mandibular en especies de *Chirostoma* (Atheriniformes: Atherinopsidae) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Hidrobiológica* 15: 161-168.
- Steindachner, F., 1894. Vorläufige Mittheilung über einige neue Fischarten aus den Seen von Mexico. *Anz. Akad. Wiss. Wien*. 31 (15): 147-149.
- Strauss, R. E. y C. E. Bond, 1990. Taxonomic methods: morphology. En: C. B. Schreck y P. B. Moyle (eds.). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Maryland. p 109-139.
- Tagliaro, C. H., M. P. Schneider, H. Schneider, I. C. Sampaio y M. J. Stanhope, 1997. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. *Mol. Biol. Evol.* 14: 674-684.

-
-
- Tagliavini, J., I. J. Harrison y G. Gandolfi, 1995. Discrimination between *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Fish Biol.* 47: 741-743.
- Tajima, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Takeyama, H., S. Chow, H. Tsuzuki y T. Matsunaga, 2001. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its applications in species identification. *J. Fish Biol.* 58: 1646-1657.
- Torres-Frías, E., 1998. Estudio merístico, morfométrico y molecular de siete especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Informe Final de Servicio Social. UAM Xochimilco. 48 p.
- Valenciennes, A., 1835. En: A. Cuvier y A. Valenciennes (eds.). *Historie Naturelle des Poisson* sp. p. 1-482.
- Villacaña Vázquez, F. y J. Morales Ventura, 2003. Experiencias en el cultivo de pescado blanco *Chirostoma promelas* en el Centro Acuícola Tizapán El Alto, Jalisco. En: p.m. Rojas y D. Fuentes (eds.). *Historia y avances del Cultivo de Pescado Blanco*. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA, México. p. 221-235.
- Vreven, E. J., B. Adepo-Gourence, J. F. Agnese y G. G. Teugels, 1998. Morphometric and allozyme variation in natural populations and cultura strains of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Bel. J. Zool.* 128: 23-34.
- Vrijenhoek, R. C., 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *J. Fish. Biol.* 53:394-412.

-
-
- Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz y A. M. Weiner, 1987. *Molecular biology of the gene*. 4^a ed. Benjamin/ Cummings Publisher Co., California. 744 p.
- Ward, R. D. y P. M. Grewe, 1995. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. En: G. R. Carvalho y T. J. Pitcher (eds.). *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman & Hall, Londres. p. 29-54.
- Ward, R. D., M. Woodwark y D. O. F. Skibinski, 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* 44: 213-232.
- Weir, B. S. y C. C. Cockerham, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- White, B. N., 1985. Evolutionary relationships of the Atherinopsinae (Pisces: Atherinidae). *Contrib. Sci. Nat. Hist. Mus.* 368: 1-20.
- Wilson, A. B., K. N. Kunnmann y A. Meyer, 2000. Incipient speciation in sympatric Nicaraguan crater lake cichlid fishes: sexual selection versus ecological diversification. *Proc. R. Soc. of Lon.* 267 (supl. B): 2133-2141.
- Winston, J. E., 1999. Further studies in systematics. En: J. E. Winston (ed.). *Describing species. Practical taxonomic procedure for biologists*. Columbia University Press, Nueva York. p. 433-454.
- Woolman, A. J., 1894. Report on a collection of fishes from the rivers of central and northern Mexico. *Bull. US Fish. Comm.* 14: 55-56.
- Yan, P., X. B. Wu, Y. Shi, C. M. Gu, R. P. Wang y C. L. Wang, 2005. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biol. Cons.* 121: 45-51.

Zhu, D., B. G. M. Jamieson, A. Hugall y C. Moritz, 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Mol. Biol. Evol.* 11: 672-683.

Zouros, E., K. E. Freeman, A. O. Ball y G. H. Pogson, 1994. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412-414.

ANEXO 1. METODOLOGIAS

A) PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN total

Empleando el Dneasy Tissue Kit (Qiagen^{MR}), se extirparon aproximadamente 25 mg de tejido branquial del pez, macerándose en un microtubo de 1.5 mL, adicionando 180 μ L de amortiguador de lisís (ATL) y 20 μ L de Proteinasa K para degradar proteínas e incubando a 55 $^{\circ}$ C de 60 a 120 minutos. Después de la incubación, fueron añadidos 200 μ L de amortiguador AL, el cual elimina los restos de tejido contenidos en la muestra, se mezcla nuevamente e incuba durante 10 minutos a 70 $^{\circ}$ C. Al terminar este periodo, se agregaron 200 μ L de etanol (100%) para hacer que el ADN precipite, obteniéndose una mezcla homogénea, la cual se depositó en una minicolumna DNeasy^{MR} para centrifugarse a 8000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante de cada una de las muestras fue decantado. Se adicionaron 500 μ L de amortiguador AW1 para centrifugar a 8000 rpm durante 2 minutos y nuevamente se decantó el sobrenadante. El uso de ambos amortiguadores permite eliminar impurezas del ADN. Posteriormente, se adicionaron 500 μ L de amortiguador AW2 centrifugando a 12000 rpm durante 3 minutos, con la finalidad de eliminar residuos de etanol. Por último, todas las minicolumnas se colocaron en un microtubo limpio de 1.5 mL a los cuales se añadieron directamente 150 μ L de amortiguador AE para hidratar el ADN, incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar a 8000 rpm durante 2 minutos, obteniéndose la primera fracción recuperada. Nuevamente la microcolumna se colocó en un microtubo limpio y previamente etiquetado de 1.5 mL, se adicionaron 100 μ L de amortiguador AE para incubar 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas durante 2 minutos a 8000 rpm para obtener la segunda fracción recuperada. Una vez terminado el procedimiento, las muestras fueron almacenadas a -70 $^{\circ}$ C.

ANEXO 1. METODOLOGIAS

B) PROTOCOLO PCR

Gen mitocondrial r16S

Empleando el Taq PCR Core Kit (Qiagen^{MR}), se preparó una mezcla en un microtubo Eppendorf^{MR} (0.2 mL) para PCR, conteniendo: 2.5 μ L de amortiguador 10xQIAGEN, 0.5 μ L (25 mM) de MgCl₂, 0.5 μ L (200 μ M) mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.5 μ L (10 μ M) cebador 16Sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y 0.5 μ L (10 μ M) cebador 16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'), 0.125 μ L de la enzima Taq DNA polimerasa (0.65 unidades), un volumen variable de agua destilada y por último, el ADN total. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L por tubo.

Región control mitocondrial

Empleando el Taq PCR Core Kit (Qiagen^{MR}), se preparó una mezcla en un microtubo Eppendorf^{MR} (0.2 mL) con contenido idéntico al antes mencionado (r16S). La diferencia estriba en los cebadores empleados: DloopR1 (5'-AACCCCCACGATTGCTGTCC-3') y DloopF (5'-CTAACTCCCAAAGCTAGGATT-3') de los cuales se añadió 1 μ L (10 μ M). A esta reacción no se le agregó MgCl₂.



Termociclador Tpersonal Biometra^{MR}

ANEXO 1. METODOLOGIAS

C) PURIFICACION DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Utilizando el sistema QIA quick (Qiagen^{MR}) se añadieron a cada muestra 5 volúmenes del amortiguador PB por 1 volumen de reacción PCR, los cuales fueron colocados en una columna QIA quick para centrifugarse durante 1 minuto a 13000 rpm. El sobrenadante obtenido fue descartado. En seguida, se adicionaron 600 μ L de amortiguador PE a las columnas para centrifugar nuevamente, el sobrenadante se descartó. Las columnas se colocaron en un microtubo limpio de 1.5 mL, para adicionar 30 μ L de H₂O incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, las muestras fueron centrifugadas durante un minuto a 13000 rpm y terminando se almacenaron a 4°C.

D) REACCIONES DE SECUENCIACION

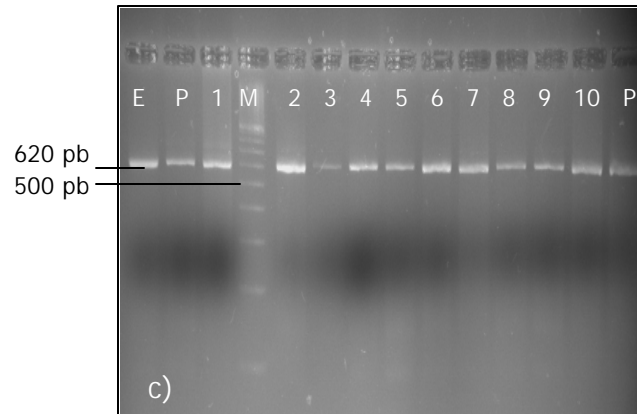
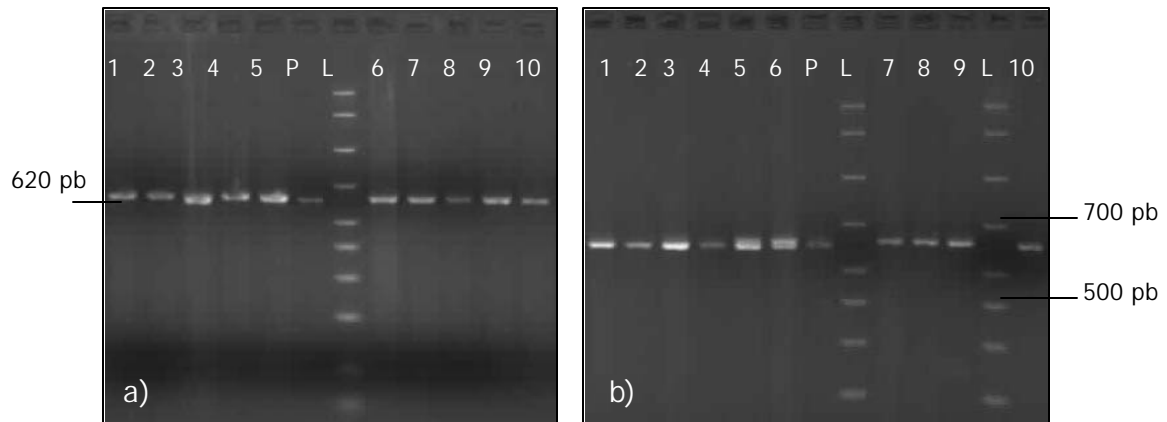
Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 10 μ L, de los cuales: 1 μ L del iniciador original de amplificación 5 pM, 3 ó 4 μ L de reacción PCR purificada (50-80 ng), 2 μ L de BigDye terminator V.3.1 y 2 μ L de amortiguador 2x de ABI PRISM^{MR}. Para completar el volumen, se incluyó agua de alta calidad. El programa de PCR de secuenciación fue: 96°C durante 1 minuto y 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 59°C de anillamiento durante 5 segundos y 60°C durante cuatro minutos. La purificación se llevo a cabo empleando columnas centriSep y 52 mg de Shepadex^{MR} G-50 con 800 μ L de agua destilada.



Secuenciador ABI PRISM^{MR} 3100 Genetic Analyzer

ANEXO 2. RESULTADOS

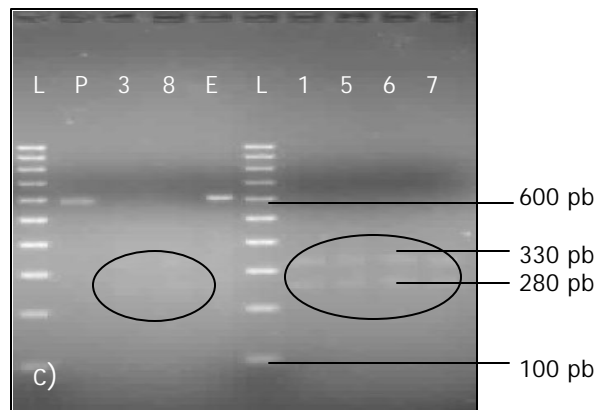
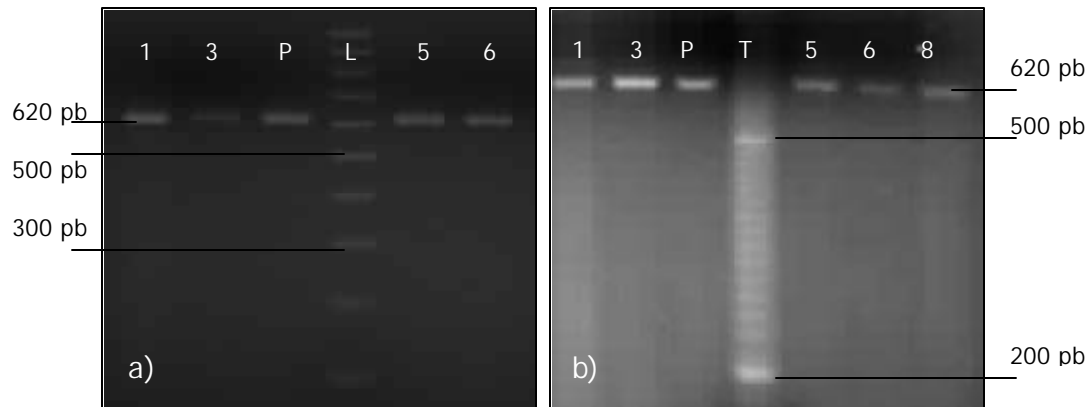
A) DISCRIMINACION MOLECULAR POBLACION PATZCUARO



Patrones de restricción enzimática observados: a) *Bsa* AI; b) *Hpy*CH4 IV y c) *Eag* I. L= marcador molecular 50-2000 pb ?DNA; M= marcador molecular 100 pb PCR ?DNA (BIO-RAD^{MR}); P= control purificado gen mitocondrial r16S ;); E= control *Chirostoma estor*.

ANEXO 2. RESULTADOS

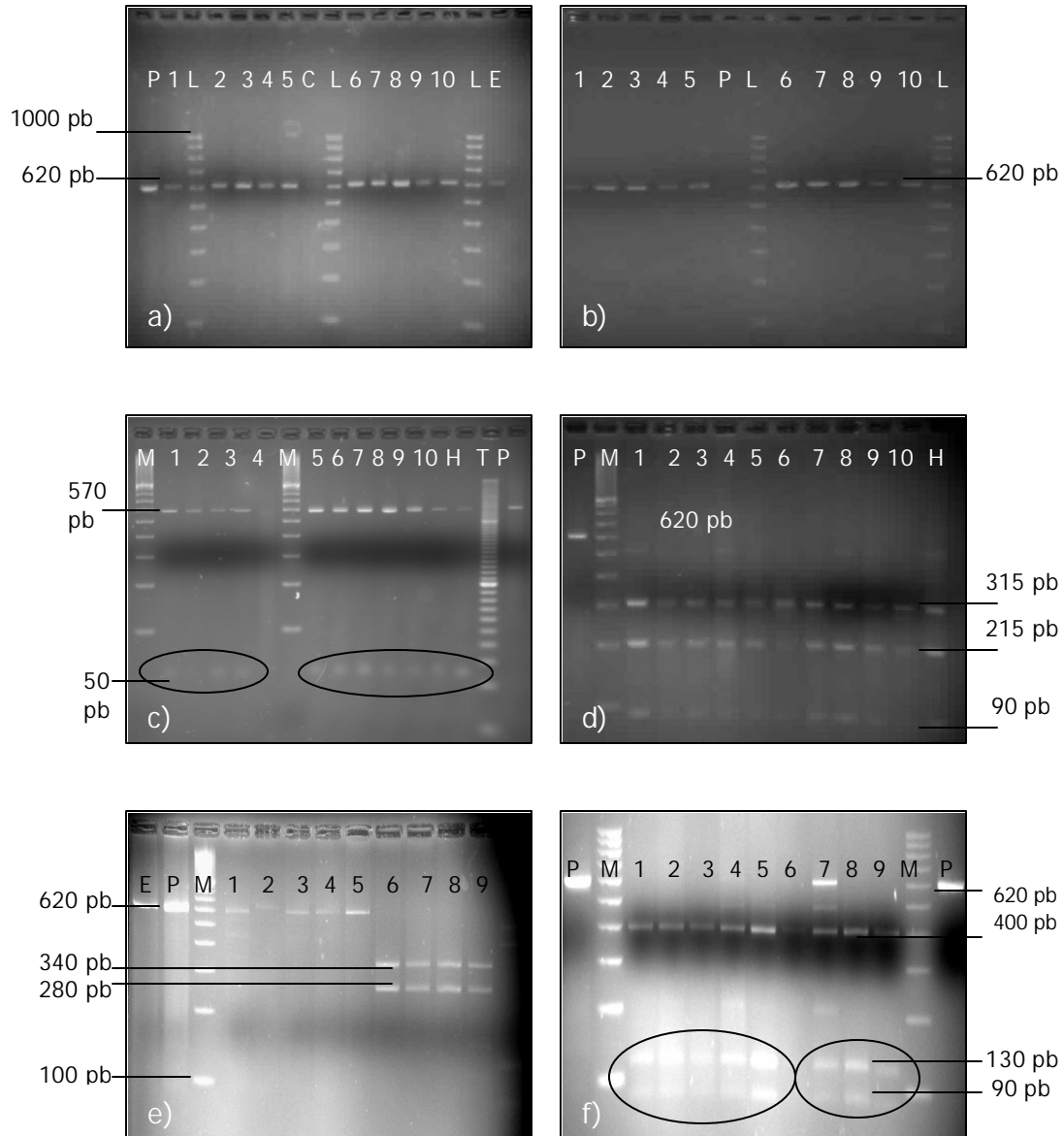
B) DISCRIMINACION MOLECULAR POBLACION CHAPALA



Patrones de restricción observados con las enzimas: a) *Bsa* AI; b) *Hpy*CH4 IV y c) *Bsm* FI. L= marcador molecular 100 pb λ DNA; T= marcador molecular 20 pb (BIO-RAD^{MR}); P= control purificado gen mitocondrial r16S; r16S; E= control *Chirostoma estor*.
Patrones observados con *Aci* I no se muestran.

ANEXO 2. RESULTADOS

C) DISCRIMINACION MOLECULAR POBLACION TIZAPAN



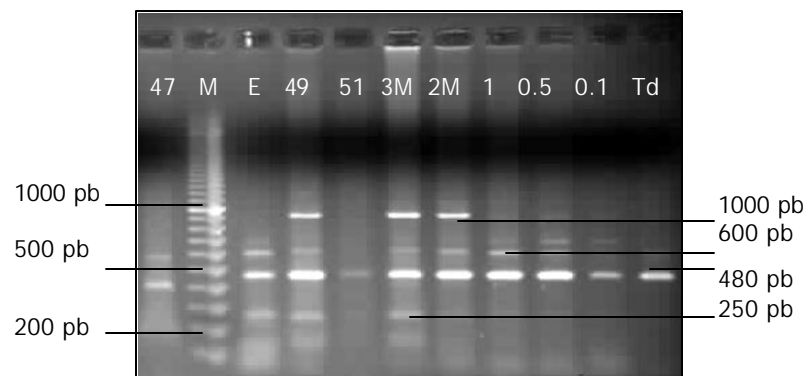
Patrones de restricción observados con las enzimas: a) *Bsa* I; b) *Eag* I; c) *Hpy*CH4 IV; d) *Bce* AI; e) *Bsm* FI y f) *Bfa* I. L= marcador molecular 100 pb ?DNA de referencia; M= marcador molecular 100 pb PCR y T= marcador molecular 20 pb (BIO-RAD^{MR}). P= control purificado gen mitocondrial r16S; E= control *Chiostoma estor* y H= control *Chiostoma humboldtianum*.

ANEXO 2. RESULTADOS

D) PRUEBAS EXPERIMENTALES DE AMPLIFICACION DE LA REGION CONTROL

Iniciadores L/H	μM L/H	mM MgCl_2	T $^{\circ}\text{C}$	Resultado	Referencia en gel
16007 16498	10 μM	3 mM	47	2 bandas: 400 y 600 pb	47
16007 16498	10 μM	1.5 mM	49	3 bandas: 250, 480 y 600 pb	E
16007 16498	10 μM	3 mM	49	4 bandas: 250, 480, 600 y 1000 pb	49
16007 16498	10 μM	3 mM	51	2 bandas: 250 y 480 pb	51
15926 16498	50 μM	3 mM	55	5 bandas: 200, 250, 480, 600 y 1000 pb	3M
15926 16498	50 μM	2 mM	47	4 bandas: 250, 480, 600 y 1000 pb	2M
15926 16498	50 μM	2 mM	51	2 bandas: 480 y 600 pb	1, 0.5, 0.1
15926 16498	50 μM	1.8 mM	51	2 bandas: 480 pb y 600 pb	Td

μM L/H= concentración inicial de los iniciadores L/H; mM MgCl_2 = concentración inicial de cloruro de magnesio; T $^{\circ}\text{C}$ = temperatura de anillamiento.



Pruebas experimentales de amplificación efectuadas con iniciadores universales. M= marcador molecular 100 pb PCR. Detalles en tabla.