

Informe final* del Proyecto H017
Sistemática molecular y poblacional de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae)

Responsable: Dr. José Luis Arredondo Figueroa
Institución: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Hidrobiología
Dirección: Av. San Rafael Atlixco # 186, Vicentina, Iztapalapa, México, DF, 09340 , México
Correo electrónico: ND
Teléfono/Fax: Tel: 5804 6585
Fecha de inicio: Mayo 31, 1996
Fecha de término: Junio 23, 1998
Principales resultados: Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Arredondo Figueroa, J. L. 1999. Sistemática molecular y poblacional de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H017.** México D. F.

Resumen:

Los objetivos iniciales del proyecto fueron los de estudiar la sistemática molecular de 7 de las especies más importantes del género, además de la exploración de la diversidad genética de dos poblaciones de *Chirostoma grandocule* (una de las especies más representativas dentro de los charales del Lago de Pátzcuaro). A casi dos años del comienzo del proyecto es importante mencionar que nuestros objetivos se han logrado casi en su totalidad y hasta la fecha se cuenta con datos tanto de morfometría como de proteínas de las siete especies en estudio (*Chirostoma grandocule*, *Ch. consocium consocium*, *Ch. humboldtianum*, *Ch. estor estor*, *Ch. lucius*, *Ch. promelas* y *Ch. sphyraena*). Los datos se suman de la siguiente manera: a) Datos morfométricos, consistentes en una base de datos de 36 variables morfométricas, necesarias para la identificación; las cuales se dividen en 19 variables morfométricas, 8 variables merísticas y 9 índices. Estos datos han sido analizados a nivel univariado y multivariado y se está preparando una publicación con estos y los datos de proteínas. b) Datos de proteínas, los cuales consisten del análisis de 18 sistemas enzimáticos probados en las 7 especies en estudio. Los resultados de dicho análisis han sido sometidos para conocer sus frecuencias alélicas, el polimorfismo de estos además de su heterocigocidad. Como se mencionó ambos datos están siendo preparados para publicarse en un estudio comparativo de las siete especies. A la fecha solamente nos restaría concluir el análisis poblacional y las secuencias de nucleótidos de algunas de las especies en estudio.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.



Casa agita al tiempo



H017

C O N A B I O

Proyecto H017. "Sistemática molecular y poblacional de especies del género *Chirostoma*
(Pisces:Atherinidae)"

INFORME FINAL

1996 -1998

Junio de 1998.

I. INTRODUCCIÓN

Las especies que comprenden al género *Chirostoma* (18 especies y 6 subespecies, de acuerdo a Barbour, 1973a), han representado hasta la fecha una riqueza endémica de la Meseta Central de México. De las siete especies comprendidas en el presente estudio, cuatro especies son simpátricas en el *Lago* de Chapala (*C. lucius*, *C. promelas*, *C. sphyraena* y *C. consocium consocium*), mientras que las otras 3 lo son para el *Lago* de Pátzcuaro (*C. grandocule*, *C. estor estor* y *C. humboldtianum*). Las especies *C. lucius*, *C. promelas*, *C. sphyraena* han sido estudiadas por diversos autores a nivel de su morfología (Álvarez, 1963, 1970 y 1972; Barbour y Chernoff, 1984 ; Rodríguez y Granado, 1987), y a nivel de proteínas (Echelle y Echelle, 1984 ; Rincón, 1992; Alaye, 1993a) para tratar de definir sus relaciones y/o encontrar caracteres discriminantes que pueden determinar sus diferencias, ya que existe un gran traslape en la mayoría de sus caracteres morfológicos.

De igual manera la distribución natural de las especies es un problema complejo que se acentúa con los programas de repoblación, implementados en los años 70. Programas llevados a cabo en un gran número de lagos y presas, principalmente en los Lagos Michoacanos y de Chapala. Por otro lado el manejo acuícola del "pescado blanco", que incluye un manejo de óvulos y espermas ha inducido de manera involuntaria a la hibridación de ésta y otras especies (tanto "pescados blancos" como charales), complicando de esta manera la identificación de las especies.

II. ANTECEDENTES

Los quirostomas, son peces pertenecientes a la clase : Osteichthyes; Subclase: Aoptinopteri; Orden: Mugiliformes; Suborden: Atherinoidei; Familia: Atherinidae. La Familia Atherinidae ésta compuesta por peces de origen marino que invadieron durante el periodo Terciario la parte meridional de la Meseta Central de la Altiplanicie Mexicana, poblando los ríos y las cuencas lacustres cuando el Río Lerma era el drenaje más importante. A finales del Terciario, debido a los procesos volcánicos se produjo un compartimento del drenaje, siendo captada la antigua Cuenca del Río Lerma por el Sistema Grande-Santiago, dando origen así a los lagos Michoacanos y de Chapala, éste último el más grande del país (Demant, 1975).

Del ancestro original marino se derivaron las especies del género *Chirostoma* que son los principales representantes de aguas continentales de la Familia

Atherinidae en América del Norte. Al producirse los cambios geológicos y geomorfológicos en el tiempo, las poblaciones de atherinidos quedaron aisladas en las cuencas interiores a lo largo del eje neovolcánico, en la Cuenca de México y en otros lagos en los estados de México, Michoacán

Jalisco y Nayarit entre otros, siendo esta zona la de mayor especiación. Barbour (1973 a y b ; 1984) señala que el género está compuesto por 18 especies y 6 subespecies, separadas en dos grandes grupos: Jordani y Arge. Nuevos estudios indican que hay dificultades para separar a las especies debido a que sus características morfométricas y merísticas se sobreponen y los estudios de genética poblacional no existen (Alaye, 1993).

La distribución y situación taxonómica de las especies de este género se ha complicado debido a que en la década de los setentas se desarrollo un programa agresivo de repoblación, por medio de la introducción de huevo aculado no identificado de varias especies de *Chirostoma* en un gran número de cuerpos de agua (lagos y presas), aún en presas del norte del país como en la Boquilla, Chihuahua; o en el *sudeste como* en la presa Malpaso, Chiapas, ampliando de esta manera su distribución natural. Se teme que la introducción de especies no nativas de *Chirostoma se haya realizado* entre los lagos de Pátzcuaro y Chapala, lo cual incrementaría la dificultad en esclarecer su taxonomía. Por otra parte, el manejo acuícola del pescado blanco de Pátzcuaro en jaulas y estanques, ha propiciado el manejo de óvulos y espermatozoides, hecho que genera el riesgo de que de manera involuntaria se esté induciendo la hibridación de esta especie y otras consideradas como "pescado blanco", como *C. lucius*, *C. humboldtianum* y *C. grandocule*.

Estas especies además de representar una riqueza científica ictiológica que es necesario preservar, durante siglos han sido fuente importante de proteínas para las poblaciones indígenas de la *Meseta* Central y posteriormente han representado un recurso de alto valor económico para las poblaciones rurales que subsisten de la pesquería de estas especies. Los impactos causados por el desarrollo industrial, agrícola y las modificaciones del hábitat natural, están ejerciendo una fuerte presión sobre las especies de este género y en algunos casos como el del pescado blanco se puede suponer en peligro de extinción, a menos que se lleve a cabo un programa de rescate que asegure su permanencia y sustentabilidad.

III. OBJETIVOS

A) GENERAL

El objetivo principal del proyecto fue el de estudiar la sistemática molecular de siete especies del género *Chirostoma* (Pisces :Atherinidae) y explorar la diversidad genética de 2 sub-poblaciones de *C. grandocule* presentes en la Meseta Central de México, con énfasis en los lagos de Pátzcuaro, Zirahuén y Chapala.

B) PARTICULARES

- Generar una base de datos de las 7 especies incluidas en el estudio.
- Generar la base de datos para 2 sub-poblaciones de *C. grandocule* del Lago de, Pátzcuaro.
- Investigar a nivel isoenzimático la sistemática de las 7 especies de estudio.
- Investigar a nivel isoenzimático la diversidad genética de 2 sub-poblaciones de *C. grandocule*.
- Investigar de forma preliminar la variabilidad genética del gene mitocondrial citocromo b de algunas de las especies de estudio, para determinar su potencial en la inferencia de las relaciones filéticas del resto de las especies.

IV. METODOLOGÍA

El desarrollo del proyecto H017 "Sistemática molecular y poblacional de especies del género *Chirostoma* (Pisces:Atherinidae)", realizado durante el periodo 1996-1998, se llevo a cabo por medio de la aplicación de 3 herramientas de análisis tanto para la parte relacionada con la sistemática, como para la poblacional, las cuales fueron : A) análisis estadístico preliminar de los datos morfométricos y merísticos de las siete especies incluidas en el estudio (*Chirostoma grandocule*, *C. consocium consocium*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. prometas*, *C. sphyraena* y *C. estor estor*). B) Análisis de isoenzimas tanto para las 7 especies como para *C. grandocule* (análisis poblacional). C) Análisis preliminar de secuencias del gene mitocondrial citocromo b, para algunas de las especies estudiadas,

IV.A) El análisis estadístico preliminar de los datos morfométricos y merísticos consistió

IV.A.1) Análisis de Componentes Principales (PCA) con varianza máxima normalizada. Por medio del cual se determinó el número de componentes que eficientemente representan la información contenida en las variables, esto por medio de la elaboración de una matriz de correlación lineal compuesta por cada par de variables (análisis tipo R), utilizando el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson. La matriz presentó una desviación

igual a 1 y una media de cero para cada variable. Posteriormente se encontraron los vectores característicos de la matriz de correlación que generan los ejes o componentes principales y las raíces características que representan la longitud de los ejes. Con el objeto de definir claramente el modelo estructural de las variables se efectuó una rotación sobre los componentes mediante la técnica Varimax descrita por Kaiser (1958), que maximiza la varianza del cuadro de cada factor, de tal forma que para cualquier número de factores ésta tiende a acercar a las variables a la unidad o a cero, lo que en la práctica es bueno y aceptable como una técnica gráfica intuitiva (Harman, 1967).

IV.A.2) Análisis de Cluster (CA). Utilizado para optimizar la partición con el criterio de agrupamiento, se calculó un coeficiente de asociación entre las especies, el cual fue el valor absoluto del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson, calculado entre pares de especies; la técnica que se utilizó para generar el dendograma fue el de "Linkage Distance".

IV.A.3) Análisis Discriminante (IDA). Utilizado para identificar la mejor combinación de las variables y maximizar las diferencias entre las especies, esto por medio de el cálculo de distancias generalizadas, ya que éstas eliminan los efectos de correlación entre los caracteres utilizados y explica las diferencias entre cada grupo con su centroide, es decir su dispersión (Libosvárky y Kux, 1982). En general dichos análisis nos permiten conocer la afinidad que existe entre dos entidades o por el contrario, la diferencia entre las mismas con base en los diversos caracteres que la describen, así ésta interrelación de caracteres origina nuevas relaciones de dependencia e independencia dentro de un complejo descriptivo (Rodríguez, 1991 y Oseguera, 1990). Los resultados de estas técnicas se graficaron sobre ejes que delimitan un espacio bi o tridimensional, acompañadas de las tablas en las que se presentan los "valores eigen", acumulación de porcentaje y el valor de la contribución de cada carácter.

IV.B) Análisis Isoenzimático. Consistió en el análisis de 17 loci enzimáticos ensayados para las siete especies (para la parte sistemática), y de 11 para *C. grandocule* (para el análisis poblacional). Con los resultados obtenidos se obtuvieron las frecuencias alélicas, las cuales fueron la base para realizar estimaciones de variabilidad como lo son la heterocigocidad (observada y esperada), polimorfismo, similitud genética y análisis de cluster.

IV.C) Secuencias Nucleotídicas del Gen Citocromo B. Por medio de la obtención de secuencias nucleotídicas de una porción del gen citocromo b de algunas de las especies

estudiadas, se pretende elucidar la utilidad de dicho gen en la inferencia de las relaciones filogenéticas de estas especies. Esto con el objetivo de que sean utilizados para estudios a futuro y que este tipo de datos pueda compararse con los resultados obtenidos con las metodologías anteriores.

V. ANÁLISIS DE DATOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies estudiadas, el tamaño de muestra, las localidades y fechas de colecta se muestran en la Tabla 1.

V.A) Análisis de Datos Morfométricos y Merísticos.

Se generan dos bases de datos, la primera con las 7 especies incluidas en el estudio; (que resulto con un número total de muestra de 263 organismos) en el que se incluyen la media, máxima y mínima de cada una de las variables (ver base de datos de las siete especies). La segunda base incluye a 2 sub-poblaciones de *C. grandocule* del Lago de Pátzcuaro (200 organismos), estas sub-poblaciones se encuentran a una distancia aproximada 20 km entre ellas. Las bases de datos incluyen las 24 variables requeridas por la CONABIO, además de 12 variables adicionales, que fueron necesarias para la "correcta" identificación de las especies.

Los datos de las 36 variables morfométricas y merísticas de las 7 especies estudiadas se transformaron a logaritmo base 10 para evitar el efecto de la talla y se sometieron a un análisis estadístico preliminar de tipo multivariado utilizando el paquete STATISTICA versión 5 (Statsoft Inc., 1993), con la finalidad de conocer las tendencias generadas por dichos datos. El análisis consistió de la aplicación de las siguientes técnicas de ordenación:

V.A.1) Análisis de Componentes Principales (PCA) con varianza máxima normalizada. Como resultado del análisis global de Componentes Principales (PCA) de la base de datos de todos los caracteres merísticos, morfométricos y los expresados en longitud estándar (36 variables en total), se obtuvo 20% de explicación de la varianza en los dos primeros componentes. Además de que se determinaron 12 caracteres, que son los que aportan mayor peso en la separación de unidades de agrupamiento. De los 12 caracteres seleccionados con mayor peso, seis son merísticos: NESLAT, NESPRES, NRADI°DO, NBRANQUI, NESCAINTE y NRADANAL ; y seis son los morfométricos expresados en longitud estándar: LCEFALIC, LHOCICO, LMANDIBU, LBASEALEA, LPEDCAUD y LOHC1°AD (representan el tamaño) (Tabla 2).

Estas variables fueron nuevamente analizadas con PCA, con los datos originales. Del análisis de PCA con datos originales, el primer componente (C.P. 1) representó el 26% de

la variación total, al segundo componente (C.P. II) le correspondió el 13%; acumulando ambos componentes el 39%. La representación gráfica se elaboró con base en los dos componentes (C.P. 1 y II) por contener la un valor de 0.80 o más de la variabilidad en el primer componente (Tabla 3). Los caracteres LCEFALIC, LHOCICO y LMANDIBU tendieron a mezclarse con un ligero acercamiento (para el C.P. I), presentando estas variables los pesos de 0.815, 0.835 y 0.801 respectivamente. El resto de las variables tendieron a separarse con variabilidad de 0.670 o menos (para el C.P. 1 y II) (Figura 1).

V.A.2) Análisis de Cluster (CA). El dendograma generado por el Análisis de Cluster por el método de "Linkage Distance", reveló en gran medida las inter-relaciones y el grado de asociación natural de las distintas *especies* estudiadas: *C. estor estor*, *C. lucius*, *C. sphyraena*, *C. humboldtianum*, *C. consocium consocium*, *C. grandocule* y *C. prometas*. Se observan dos grandes agrupaciones o ciados con *C. prometas*, separándose de ambos ciados, por lo que parece ser la especie más alejada del resto (0.058). Uno de los clados o grupos incluye a tres de las especies : *C. grandocule*, *C. consocium consocium* y *C. humboldtianum*, *el cual* alcanzó una distancia intermedia de 0.024. Este ciado parece estar más cercanamente relacionado en distancia a *C. prometas*. El otro ciado que también grupa a tres especies : *C. estor estor*, *C. lucius* y *C. sphyraena* presenta una menor distancia (0.011). Este último ciado parece estar más alejado en distancia de *C. prometas*. Las especies con mayor similitud de distancia en el primer ciado fueron *C. sphyraena* y *C. lucius* de 0.003, las cuales se encuentran junto a *C. estor estor* que se distingue por presentar una distancia de 0.011. De igual manera el segundo ciado incluye a dos especies con alta similitud de distancia: *C. humboldtianum* y *C. consocium consocium* con 0.019, las cuales se encuentran unidas a *C. grandocule* con 0.024. En forma general se presenta las relaciones más importantes entre (*C. estor estor*, *C. lucius*, *C. sphyraena*, *C. humboldtianum*, *C. consocium consocium* y *Ch. grandocule*) (Figura 2).

V.A.3) Análisis Discriminante (DA). Los resultados obtenidos por medio del Análisis Discriminante muestran que las variables NESLAT, NESPRES, NRAD1°DO, NBRANQUI, NESCAINTE y LBASEALEA son consideradas las más importantes ya

que separaron las diferencias entre especies, determinándose que estas variables fueron las que representan "la forma" (Tabla 4). Se analizó la dispersión de cada especie y se aprecia que entre *C. grandocule*, *C. consocium consocium* y *C. humboldtianum* existen diferencias por su dispersión, siendo esta mayor para *C. grandocule*.

Lo anterior se caracteriza por que dichas especies presentan una distribución de espacio definida asociado en particular por las divergencias morfológicas. Además las especies *C. estor estor*, *C. lucíos*, *C. sphyraena* y *C. promelas* no se encontraron dispersos, ya que no presentan una distribución de espacio definida, puesto que algunos organismos de estas especies se traslapan entre ellas mismas, tal vez por la similitud en algunos de sus caracteres. Con esto podemos observar una clara separación de la especie *C. grandocule* que se sitúa en la parte positiva del eje uno discriminante, frente a *C. humboldtianum* que se localiza en la zona positiva del mismo eje. Respecto al segundo eje, *C. consocium consocium* no se sitúa en forma determinada en dicho eje, puesto que una parte de los individuos se integran en el primer eje positivo discriminante. Para el resto de las especies (*C. estor estor*, *C. lucius*, *C. sphyraena* y *C. promelas*) se observa por el contrario una situación predominante en la zona negativa del primer eje discriminante (Figura 3).

V.B) Análisis Molecular "Isoenzimas 7 Especies Del Genero Chirostoma"

El total de enzimas ensayadas en el análisis de las 7 especies fue de 17: Glucosa 6 fosfato isomerasa (GPI), Fosfoglucomutasa (PGM), Lactato deshidrogenasa (LDH), Alcohol deshidrogenasa (ADH), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Xantin deshidrogenasa (XDH), Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH), Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), Hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD), Glucosa deshidrogenasa (GDH), Enzima málica (ME), Malato deshidrogenasa (MDH), Fosfatasa alcalina (ALP), Glutamato transaminasa (GOT), Hexoquinasa (HEX), y Superóxido dismutasa (SOD).

De las 17 enzimas ensayadas, en cinco no se detectó actividad [Superóxido dismutasa (SOD), Glutamato transaminasa (GOT), Fosfatasa alcalina (ALP), Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la Hexoquinasa (HEX)]. Tres enzimas fueron polimórficas [Glucosa 6 fosfato isomerasa (GPI), Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) y la Fosfoglucomutasa (PGM)]. Nueve enzimas más fueron monomórficas [Alcohol deshidrogenasa (ADH), Lactato deshidrogenasa (LDH), Malato deshidrogenasa (MDH), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Xantin deshidrogenasa (XDH), Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH), Hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD), Glucosa deshidrogenasa

(GDH), y la enzima málica (ME)].

V.B.1) Frecuencias Alélicas, Identidades Genéticas y Análisis de Cluster. Las frecuencias alélicas (Tabla 5), de las siete especies estudiadas fueron utilizadas para estimar el Índice de identidad genética (I) de Nei (1978), para todas las combinaciones pareadas en la muestra.

La matriz de distancias/identidades genéticas (Tabla 7), se resume en el dendrograma (cluster análisis) por el método promedio inter-grupal sin ponderación con media aritmética (UPGMA) (Figura 4).

En el dendrograma se observan dos agrupaciones o clados principales, de los cuales *Chirostoma grandocule* (gra) parece ser el más alejado de las siete especies ($D = 0.140$). El clado que agrupa al mayor número de especies es aquel en el que se encuentran *C. prometas* (pro), *C. lucios* (luc) y *C. sphyraena* (spy), el cual es el menos divergente ($I = 1.000$). En el otro clado se encuentran juntos *C. humboldtianum* (hum), *C. consocium consocium* (con) y *C. estor estor* (est), los cuales son equidistantes ($D = 0.018$). Estos dos clados parecen estar más cercanamente relacionados ($I = 0.986 - 0.980$) entre sí que con *C. grandocule* ($I = 0.838 - 0.898$).

Debido al pequeño tamaño de muestra, para todos los análisis se juntaron las muestras de cada especie de 1 ó 2 localidades (ver Tabla 1), Las siete especies estudiadas se encuentran tanto en el Lago de Pátzcuaro como en el Lago de Chapala, con excepción de *gra* que se encontró durante éste estudio solamente en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán lo cual demuestra el rompimiento de barreras físicas que alguna vez funcionaron como barreras biológicas entre grupos de especies. A lo anterior creemos que se puedan deber los altos niveles de identidad genética poco usuales a nivel inter-específico (Tabla 7) y las diferencias alélicas fijas no observadas en la mayoría de los alelos. Por otro lado, también se cree que existe hibridación entre algunas de estas especies (Barbour 1973b; Barbour & Chernoff 1984; Oseguera 1990), lo cual también pudiese estar influenciando la no diferencia entre las distancias genéticas de luc, pro y sph. Aunque cabe mencionar que los individuos analizados en el presente estudio fueron identificados en su etapa adulta. Etapa en la que teóricamente se caracterizan por presentar estructuras morfológicas bien definidas a nivel de especie, por ejemplo luc (talla promedio 215 mm y mandíbula inferior proyectada), pro (talla promedio 166 mm y hocico negro), sph (mayor número de escamas interdorsales y talla promedio 149 mm) y est (talla promedio 300 mm y mayor número escamas de línea lateral). Mientras que con (mayor número de escamas predorsales y talla promedio 125 mm), y hum

(menor número de escamas predorsales, hocico chato y talla promedio 129 mm). No se observan diferencias intra-específicas significativas en las frecuencias alélicas, aun cuando existen muestras de diferentes localidades (ejem. *C. estor* del Lago de Pátzcuaro y del Lago de Chapala; *C. hurnboldtianum* del Ctro. Acuícola de Zacapú, Mich., y del Lago de Chapala, Jalisco; y *C. consocium consocium* del Lago de Pátzcuaro y del Lago de Chapala).

Este fenómeno pudiera atribuirse al pequeño número de muestra en nuestro estudio. Aunque Echelle & Echelle (1984) trabajando con un número de muestra un poco mayor (8 - 50), tampoco encuentran diferencias significativas en las frecuencias alélicas intra-específicas.

V.B.2) Variabilidad Genética. En éste análisis se estiman tres medidas de variabilidad genética: heterogeneidad media por locus (H_o = observado y H_e = esperado por Hardy-Weinberg), además del porcentaje de loci polimórficos (P , bajo los criterios de .99 y .95) (Tabla 6). Las estimaciones se realizaron para un total de 23 loci examinados en todas las especies y poblaciones en el estudio. No se encontraron diferencias significativas para H , $P_{.95}$ ó p_{ss} entre las especies de *Chirostoma*. En la Figura 5 se muestra el gráfico de P y H de las 7 especies estudiadas. El promedio del polimorfismo es, $P_{.95} = 0.13$, el cual se encuentra dentro de los rangos reportados para peces (Echelle & Echelle, 1984, Hartl, 1987). La heterogeneidad también se encuentra dentro de los rangos reportados para peces $H = 0.072$, (Echelle & Echelle, 1984, Hartl, 1987). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Echelle & Echelle (1984) para 15 especies de *Chirostoma*, dos especies de Poblana, dos de Menidia y otros atherinidos. El polimorfismo encontrado en *C. grandocule*, (0.00) se debe al número de muestra (ver análisis poblacional),

V.B.3) Isoenzimas *C. grandocule* (Poblacional)

Para el análisis de la diversidad genética de *C. grandocule* se utilizaron seis enzimas (en base a los resultados del análisis de las siete especies), las cuales fueron: dos que resultaron polimórficas en este análisis GPI y PGM, aunque los niveles de polimorfismo resultaron bajos (altas frecuencias de los alelos dominantes, ver Tabla 8); y cuatro que resultaron ser monomórficas tanto en este análisis como en el de sistemática, LDH, ADH, IDH y 6PGDH, estos loci fueron utilizados ya que se esperaba encontrar variabilidad en un tamaño de muestra más elevado (99 -100).

Las enzimas codificaron un total de 11 loci en ambas poblaciones con un número total de 17 alelos. La población Ichupio'97 no presenta los alelos *GPI-1a* y *GPI-3c*, Sin

embargo el primer alelo (GPI-1 a) y el alelo GPI-2a, se presentan como raros en la población Janitzio'96, además del alelo GPI-1 b. Ichupio'96 también presenta un alelo raro en el loci PGM (a).

V.B.4) Frecuencias Alélicas, Variabilidad Genética y Similaridad Genética. En la tabla 8, de frecuencias alélicas, se muestran los alelos raros GPI-1 a, GPI-2a y PGMA, de

las poblaciones Janitzio'96 e Ichupio'97 (frecuencias de 0.005 = alelos, que generalmente se encuentran en 1 y 211000 individuos). Aunque se encontraron algunas variantes en cuatro loci de la población Janitzio'96 (GPI-1, GPI-2, GPI-3 y PGM), estos no se determinaron como polimórficos, debido a las altas frecuencias de los alelos dominantes (0.985 - 0.990). Debido a lo anterior la proporción de loci polimórficos resultó ser de 0.09 para la población Janitzio'96, y de 0.18 para la población Ichupio'97 (Tabla 10). La heterocigosidad promedio observada (H_o) para cada población fue de 0.019 y 0.047, muy cercana a la esperada ($H_e = 0.020 - 0.042$), también para cada población (Tabla 9), Estos valores caen dentro de los rangos reportados para estudios poblacionales de crustáceos ($P = 0.10$, Almirante 1993).

La distancia genética (D) calculada a partir de las frecuencias alélicas de 11 loci fue muy cercana a 0 (0.003) entre las dos poblaciones. De igual manera la identidad genética (I) fue casi de 1.0 entre las dos poblaciones (0.997). Estas distancias parecen reflejar un distanciamiento importante entre estas dos poblaciones, por lo que se sugiere la existencia de un aislamiento genético distintivo entre las poblaciones (Tabla 9). Almirante (1993) obtiene resultados muy similares en la distancia genética (D) de varias poblaciones de camarones japoneses.

V.C) Secuencias Nucleotídicas del Gen Citocromo B. Se obtienen secuencias de algunas de las especies estudiadas, con el objetivo de elucidar la utilidad de dicho gen en el establecimiento de las relaciones filogenéticas moleculares entre las especies del estudio. Se obtiene secuencias preliminares para *C. estor* y *C. consocium* por medio del Sistema AbiPrism DNA Sequencing de Perkin Elmer de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana. Observándose un total aproximado de 9% sustituciones nucleotídicas en un estrecho de aproximadamente 388 pares de bases, lo cual nos hace

pensar, que éste gen contiene la información necesaria para inferir las relaciones filogenéticas de las siete especies en estudio (Figura 6). Por lo anterior, nos queda sugerir, que esta parte del proyecto continúe, ya que estos resultados parecen prometedores.

VI CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos tanto a nivel de sistemática, como del análisis poblacional, se concluye lo siguiente:

- *Se cubrió en su totalidad con los objetivos* planteados en el proyecto.

VI.A) Análisis morfométrico y merístico

- Se registraron 12 variables adicionales (ver base de datos: *Chirostoma grandocule* población Janitzio-1996 y población Ichupio 1997 ; y base de datos de 7 especies del género *Chirostoma*) a las 24 requeridas en el Anexo 3 del Convenio FB3041H017196.

- De las 36 variables registradas, solamente 12 de ellas (ELL, EPD, EID, BQE, RAA, RAD LC*, LH*, LM*, LBA*, PC*, y DHD*) fueron las más útiles en la discriminación de las especies. Lo cual resulta tanto del análisis univariado como del multivariado (Análisis de Componentes Principales).

- La especie que tiene menos problemas a nivel morfométrico para su identificación es *Chirostoma grandocule*, por presentar el mayor número de branquiespinas, aunque se encontraron organismos hasta de 100 mm (LT). Por su parte *C. sphyraena* y *C. lucius*, presentan un traslape de caracteres, similar al reportado por Chernoff y Barbour (1984).

- Tanto el Análisis de Cluster como el Discriminante demuestran que las especies *C. sphyraena*, *C. lucius* y *C. promelas* difícilmente se discriminan.

- El análisis poblacional de *Chirostoma grandocule* a nivel estadístico muestra una alta homogeneización tanto en las 36 variables como en las 12, lo cual nos indica que se requiere de un análisis más escrupuloso de los datos.

VI.B) Análisis Isoenzimático

- Los valores encontrados para la variabilidad genética de los 23 loci en las 7 especies se encuentran dentro de los rangos reportados para peces (Echelle & Echelle, 1984, Hartl, 1987).

- La topología del dendograma, basado en las distancias genéticas (Nei 1972, distancia mínima) agrupa 2 clados, uno en el se agrupan *C. promelas* y *C. lucius* y *C. sphyraena* sin diferenciación entre ellas ($D = 0.000-0.001$) ; y el segundo clado en el que se agrupan *C. humboldtianum* y *C. consocium consocium* y *C. estor estor* con una $D = 0.018$. *C. grandocule* presenta la misma distancia tanto para el primer como el segundo clado ($D = 0.140$).

- La presencia de alelos raros en el análisis isoenzimático poblacional para *C. grandocule* (*GPI-1a*, *GPI-2a*, *GPI-3c* y *PGMa*), pudiera estar relacionado a el hecho de que el número de muestra aumentó, aunque se reporta que estos alelos generalmente se observan

encuentran en frecuencias de 1 y 211000 individuos.

- El polimorfismo observado en ambas poblaciones (0.09 - 0.18), se encuentra dentro de los valores observados en otros estudios poblacionales (Almirante 1993).

- La distancia genética observada ($D = 0.003$) en el análisis poblacional parece reflejar un distanciamiento importante entre estas dos poblaciones, por lo que se sugiere la existencia de un aislamiento genético distintivo entre las poblaciones.

VI.C) Análisis de la secuencia de una región de gen mitocondrial Citocromo b de dos de las especies en estudio.

- De lo que se encuentra secuenciado hasta la fecha, 181 pares de bases (pb) de *C. estor* y 207 pb de *C. consocium* (56 y 63 aa respectivamente), se puede observar que la región amplificada es una región que presenta suficiente variabilidad (transiciones y transversiones) ya que por ejemplo se observa un de 9% de sustituciones nucleotídicas, además de 7 inserciones/delecciones.

Como conclusión general, se remarca la importancia de continuar investigando los aspectos que se analizaron en el presente proyecto como preliminares y que no se incluyeron dentro de los objetivos del mismo, por ejemplo : el análisis estadístico multivariado tanto para las siete especies en estudio como para el estudio poblacional ; además del análisis de secuenciación del gen citocromo b de las cinco especies restantes.

VII. BIBLIOGRAFIA:

- Alaye, R.N. 1993b. El pescado blanco (género *Chirostoma*) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, composición de especies. *Ciencia Pesquera*. México. 9:113-128.
- Almirante, N. A. 1993. Differentiation of the Palaemonid shrimp, *Macrobrachium nipponense*, in Japanese Islands. PhD. Thesis. Tokio University of Fisheries.
- Alvarez, J. 1963. El pez blanco de Zacapú, nueva especie para la ciencia. *Ciencia*. 22(6):197-200.
- Alvarez del Villar, J. 1970. Peces mexicanos. Secretaría de Industria y Comercio. México. p. 120-128.
- Alvarez del Villar, J. 1972. Ictiología Michoacana V. Origen y distribución de la ictiofauna dulceacuícola de Michoacán. *An. Ese. Nac. Cien. Biol. México*; 19:155-161.
- Barbour, C. D., 1973a. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma*, Swaison. *Tulane Studies in Zoology and Botany* 19 (3):97-141.
- Barbour, C. D., 1973b. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces:Atherinidae). A species flock from the Mexican plateau. *Copeia* 3:533-566.
- Barbour, C. D., and Chemoff B., 1984. Comparative morphology and morphometrics of the pescados blancos (genus *Chirostoma*) from lake Chapala, México, 111-127 In: A. A. Echelle, I. Kornfield eds. *Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. Maine Press at Toronto.
- Demant, A, y C. Robin, 1975. "Las fases del volcanismo en México. Una síntesis en relación con la evolución geodinámica desde el cretácico". *Rev. Inst. Geología. UNAM* 75 (1) : 70-83.
- Echelle, A. A. and Echelle A. F. , 1984. Evolutionary Genetics of a "Species Flock:" Atherinid Fishes on the Mesa Central of México. Pag. 93:110 In: A. A. Echelle, I. Kornfield eds. *Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. Maine Press at Toronto.
- Harman, H. H., 1976. *Modern factor analysis*. 2nd ed. Univ. Chicago. Press, Chicago. 474 p.
- Hartl, D. L. 1987. *A Primer of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland, Mass.
- Hebert, D. N. P., and Beaton, M. J. 1989. *Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis: A Practical Handbook*. Helena Laboratories. Beaumont Tx.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Oseguera F. L. 1990. Caracterización morfológica de estadios embrionarios y juveniles de *Chirostoma grandocule* Steindachner (1896) y verificación del híbrido con *C. attenuatum* Meek (1902) del Lago de Pátzcuaro, MiC., México. Tesis Profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pag 108.

- Rincón, C.C. 1992. Estudio de polimorfismo de hemoglobina para la identificación de las especies del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro Michoacán, México. Tesis. Universidad Michoacana, San Nicolas de Hidalgo. 68p.
- Rodríguez, R. A. y Granado, L. C. 1987. Estudio morfológico del aparato mandibular en cinco especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Universidad de Sevilla, España. *Rev. Biol. Trop.* 35(1):97-105.
- Rodríguez, E.C. 1991. Verificación a nivel experimental de la existencia de híbridos entre las especies *Chirostoma estor* y *Chirostoma grandocule*. (Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Mich. México. Tesis, Universidad Michoacana, San Nicolas Hidalgo. 101 p.
- Swofford, D. L and Selander R. B. 1981. BIOSYS-1: a FORTRAN program for comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72:281-282
- Tabaschnick, B. G. and Fideli, L. S., 1983. Using multivariate statistics. Harper International Edition. New York. 509 p.

ANEXO 1

Tablas 1 - 10

Figuras 1 - 6

Tabla 1.- Muestra las especies identificadas de *Chirostoma* incluidas en el presente estudio.

El tamaño de muestra (N), localidad y fecha de colecta.

ESPECIES	TAMAÑO DE MUESTRA (N)	LOCALIDAD	FECHA DE COLECTA
<i>C. lucius</i>	13	Petatán, Tepehuaje, Agua Caliente y Ctro. Acuícola de Tizapán (Lago de Chapala, Jalisco) y Ctro. Acuícola de Zacapú, Mich.	Agosto, 1996
<i>C. sphyraena</i>	12	Petatán, Tepehuaje, Agua Caliente y Ctro. Acuícola de Tizapán (Lago de Chapala, Jalisco)	Agosto, 1996
<i>C. promelas</i>	14	Tepehuaje, Mismaloya, Agua Caliente y Ctro. Acuícola de Tizapán (Lago de Chapala, Jalisco)	Agosto, 1996 Abril, 1997
<i>C. humboldtianum</i>	55	Petatán, Tepehuaje, Mismaloya (Lago de Chapala, Jalisco) y Ctro. Acuícola de Zacapú, Mich. Lago de Zirahuén, Mich. e Ichupio (Lago de Pátzcuaro, Mich.)	Agosto, 1996 Sept. 1996
<i>C. estor estor</i>	25	Petatán, Tepehuaje, Mismaloya y Agua Caliente y Ctro. Acuícola de Tizapán (Lago de Chapala, Jalisco). San Jeronimo y Ojo de Agua (Lago de Pátzcuaro, Mich.)	Agosto, 1996 Mayo, 1997
<i>C. c. consocium</i>	96	Tepehuaje, Mismaloya y Agua Caliente (Lago de Chapala, Jalisco). Ichupio (Lago de Pátzcuaro, Mich.)	Agosto, 1996
<i>C. grandocule</i>	48* 200 **	Janitzio e Ichupio (Lago de Pátzcuaro, Mich.)	Junio, 1996 Mayo, 1997

* Estudio de las siete especies **
Estudio poblacional

Tabla 2. Caracteres (variables) morfométricas y merísticas consideradas para el análisis de PCA por ser de mayor peso para el análisis de las 7 especies.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN	TIPO
NESLAT	No. escamas de la línea lateral	Merístico
NESPRE	No. de escamas predorsales	Merístico
NRAD1°DO	No. radios de la 1° aleta dorsal	Merístico
NBRANQUI	No. branquiespinas	Merístico
NESCAINTE	No. escamas de la línea lateral	Merístico
NRADANAL	No, escamas predorsales	Merístico
LCEFALIC	Longitud cefálica	Morfométrico
LHOCICO	Longitud del hocico	Morfométrico
LMANDIBU	Longitud mandibular	Morfométrico
LBASEALEA	Longitud base de la aleta anal	Morfométrico
LPEDCAUD	Longitud pedúnculo caudal	Morfométrico
LHOC1°AD	Longitud del hoc. a la aleta dorsal	Morfométrico

Tabla 3. Valores de contribución de las variables morfométricas y merísticas (datos originales) en los componentes 1 y 11 mediante el PCA para las 7 especies estudiadas.

VARIABLES	COMPONENTE I	COMPONENTE II
NESLAT	-.083693	.460966
NESPRE	.524201	.594855
NRAD1 °DO	.034804	.415574
NBRANQUI	-.436430	-.116806
NESCAINTE	.304927	.436003
NRADANAL	-.230891	.595574
LCEFALIC	.815688 *	.001407
LHOCICO	.835793 *	.121967
LMANDIBU	.801802 *	.099830
LBASEALEA	-.344232	.101718
LPEDCAUD	-.191388	-.581459
LHOC1 ⁰ AD	.670834	.029488
EXPL. VAR.	3.231692	1.6711649
PRP. TOTAL	.269308	.139304

* Denota los caracteres de mayor contribución para cada uno de los componentes.

Tabla 4. Resultados de la función del análisis discriminante basado en las características merísticas y morfométricas que contribuyen significativamente en la separación de las especies.

VARIABLES	P-LEVEL
No. escamas de la línea lateral	0.000000*
No. de escamas predorsales	0.000000*
No. radios de la 1ª aleta dorsal	0.000002*
No. Branquiespinas	0.000000*
No. escamas de la línea lateral	0.000000*
No. escamas predorsales	0.014346
Longitud cefálica	0.019410
Longitud del hocico	0.007676
Longitud mandibular	0.058546
Longitud base de la aleta anal	0.000000
Longitud pedúnculo caudal	0.138930
Longitud del hoc. a la 1ª aleta dorsal	0.001201

* Valores significativamente representativos

Tabla 6. Variabilidad Genética de 23 loci enzimáticos en las siete especies de estudio.
(Error estándar en paréntesis).

Población	N/locus	alelos/locus	p	Ho	He
1 pro	12.0 (.0)	1.2 (.1)	0.17	.087 (.048)	.070 (.033)
2 hum	14.0 (.0)	1.3 (.1)	0.17	.096 (.050)	.075 (.035)
3 est	16.0 (.0)	1.2 (.1)	0,17	.087 (.053)	.077 (.036)
4 luc	11.0 (.0)	1.1 (.1)	0.13	.051 (.043)	.059 (.033)
5 con	20.0 (.0)	1.2 (.1)	0.13	.078 (.048)	.059 (.033)
6 sph	5.0 (.0)	1.1 (.1)	0.13	.113 (.063)	.063 (.035)
7 gra	20.0 (.0)	1.0 (.0)	0.00	.002 (.002)	.002 (.002)

N/locus = Tamaño promedio de muestra
P = Porcentaje promedio de loci
polimórficos Ho = Heterocigosidad
observada He = Heterocigosidad esperada
(HdyWbg)

* Un locus se considera polimórfico cuando
la frecuencia del alelo más común no excede
.95

Tabla 7. Matriz de Identidad genética (debajo de diagonal) y Distancia genética (arriba de diagonal) de Nei (1978).

Población	1	2	3	4	5	6	7
1 pro	*****	.022	.018	.000	.014	.000	.176
2 hum	.979	***	.010	.023	.010	.014	.140
3 est	.982	.990		.019	.019	.011	.107
4 luc	1.000	.978	.981		.014	.000	.177
5 ccon	.986	.990	.981	.986	*	.009	.160
6 sph	1.000	.986	.989	1.000	.991	***	.164
7 gran	.838	.869	.898	.838	.852	.849	**

Tabla 8. Frecuencias alélicas de 11 loci en dos poblaciones de *C. grandocule* genética (error estándar en paréntesis).

Locus	Población	
	Janitzio'96	Ichupio'97
GPI-1		
(N)	(100)	(99)
a	.005	.000
b	.985	.899
c	.010	.101
GPI-2		
a	.005	.051
b	.990	.848
c	.005	.101
GPI-3		
b	.925	1.000
c	.075	.000
PGM		
a	.015	.005
b	.985	.995
LDH-1		
a	1.000	1.000
LDH-2		
a	1.000	1.000
IDH-1		
a	1.000	1.000
IDH-2		
a	1.000	1.000
ADH-1		
a	1.000	1.000
ADH-2		
a	1.000	1.000
6PGDH		
a	1.000	1.000

Tabla 9. Matriz de Identidad genética poblaciones (abajo de diagonal) y distancia (arriba de diagonal) de nei (1978).

Población	1	2
1 Janitzio'96	*****	0.003
2 Ichupio'97	0.997	*****

Tabla 10. Variabilidad genética de 11 loci enzimáticos en las dos poblaciones en estudio (Janitzio'96 e Ichupio'97). Error estándar en paréntesis

Población	Nliocus	alelos/locus			
Janitzio'96	100	1.5 (.2)	0.09	.019 (.013)	.020 (.012)
Ichupio'97	99	1.4 (.2)	0.18	.047 (.031)	.042 (.028)

Nliocus = Tamaño promedio de muestra
P = Porcentaje promedio de loci
polimorficos Ho = Heterocigosidad
observada He = Heterocigosidad esperada
($Hd \sqrt{Whe}$)

* Un locus se considera polimorfica cuando
la frecuencias del alelo más coman no excede
.95

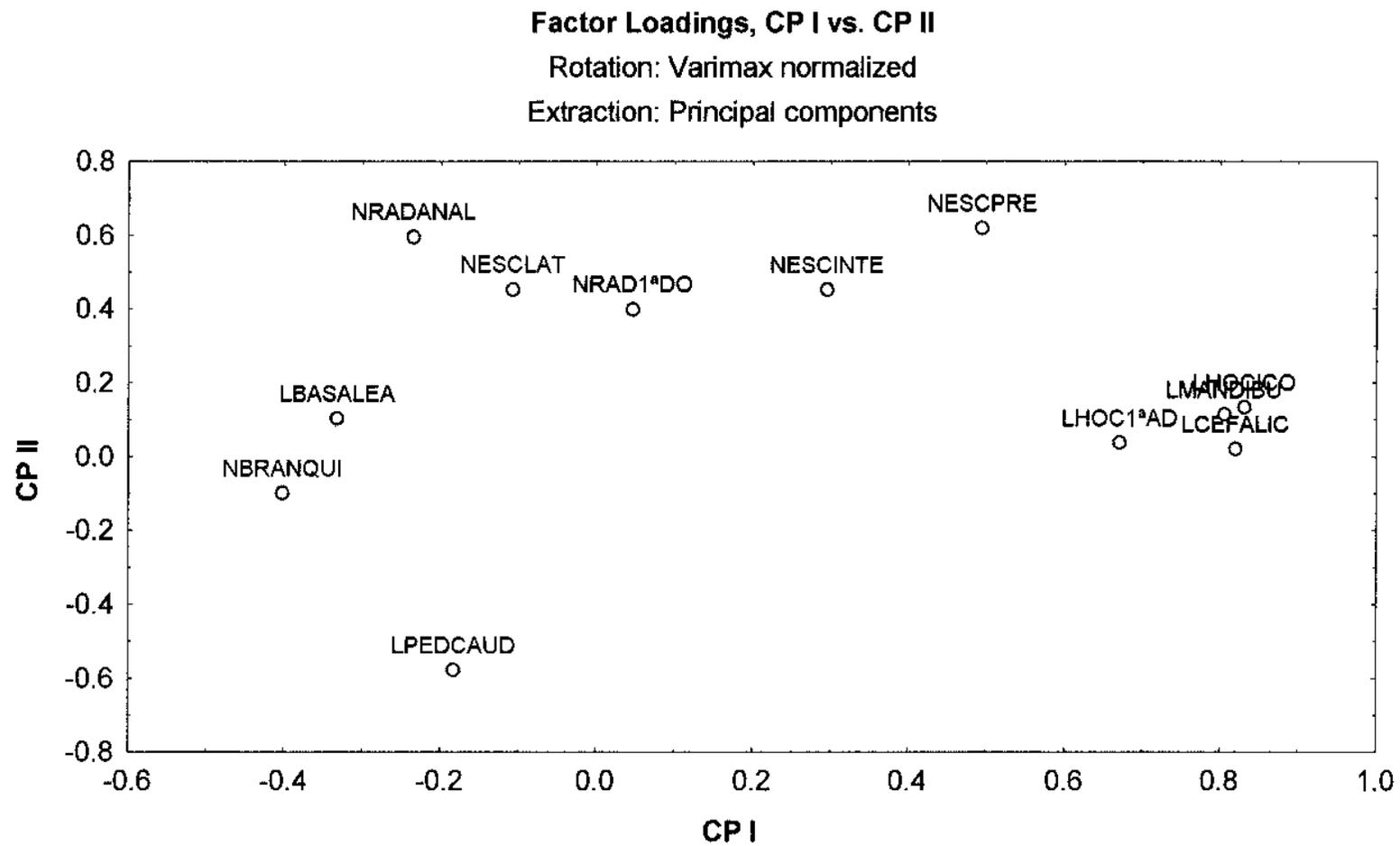


Figura 1. Representación esquemática del análisis de los componentes 1 y II generado por el análisis de *componentes* principales (PCA), de las 12 variables merísticas y morfométricas.

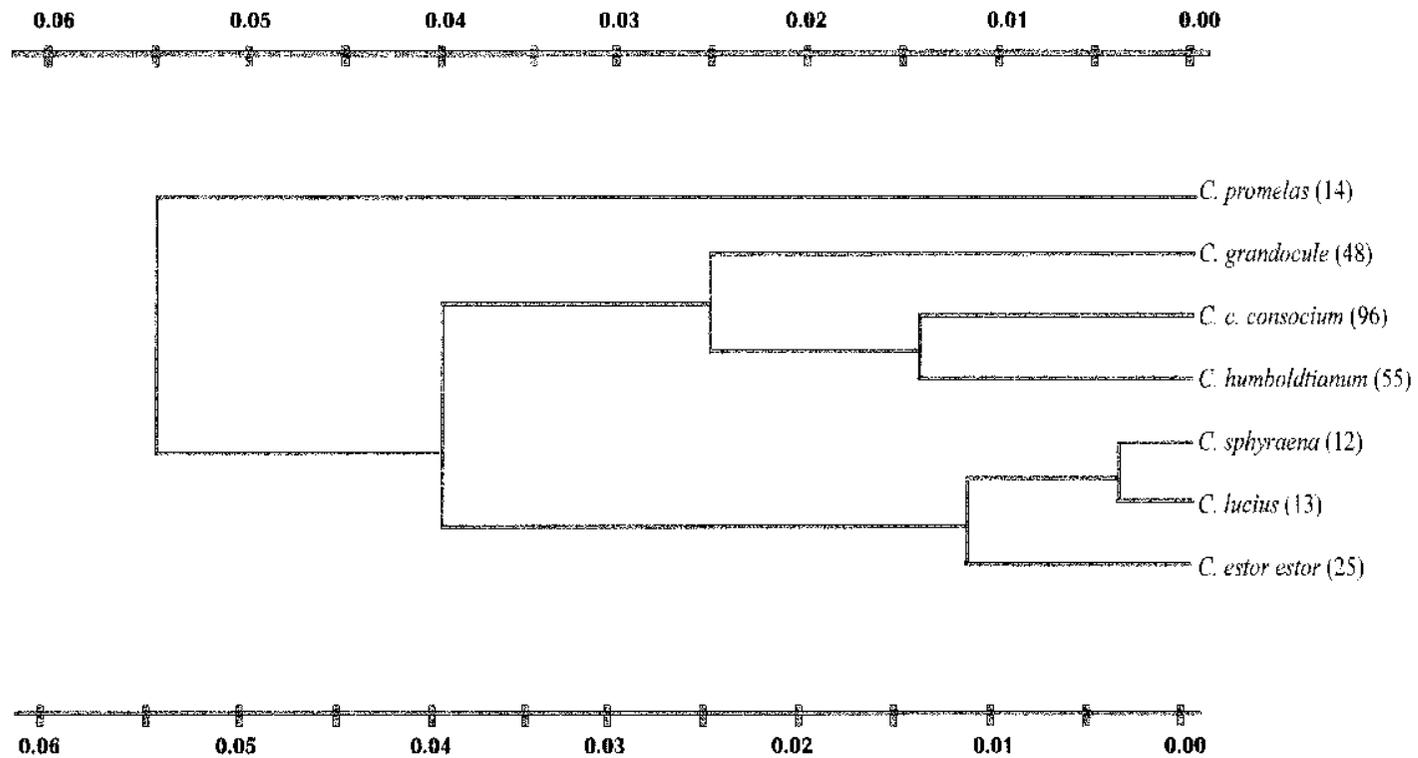


Fig. 2 . Dendrograma generado por Linkage Distante donde se agrupan las 7 especies: *Ch. estor estor*, *Ch. lucius*, *Ch. sphyraena*, *Ch. humboldtianum*, *Ch. consocium consocium*, *Ch. grandocule* y *Ch. promelas*. El número entre paréntesis representa el número de muestra.

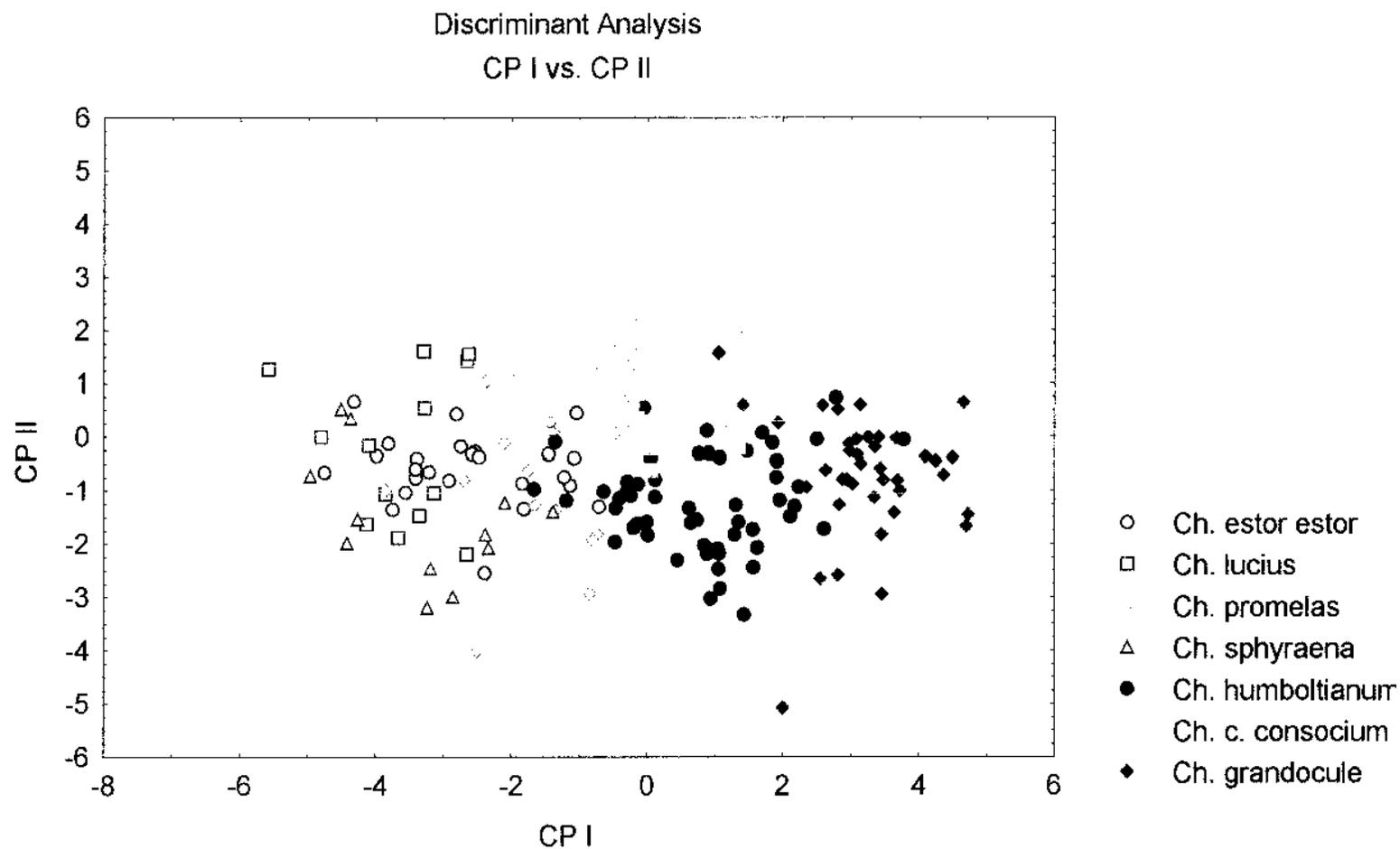


Figura 3. Análisis discriminante, en donde se observa la distribución de *las especies en un espacio* definido por los CP I y II, sobre los ejemplares de *C. estor estor*, *C. lucios*, *C. sphyraena*, *C. humboldtianum*, *C. consocium consocium*, *C. grandocule* y *C. prometas*.

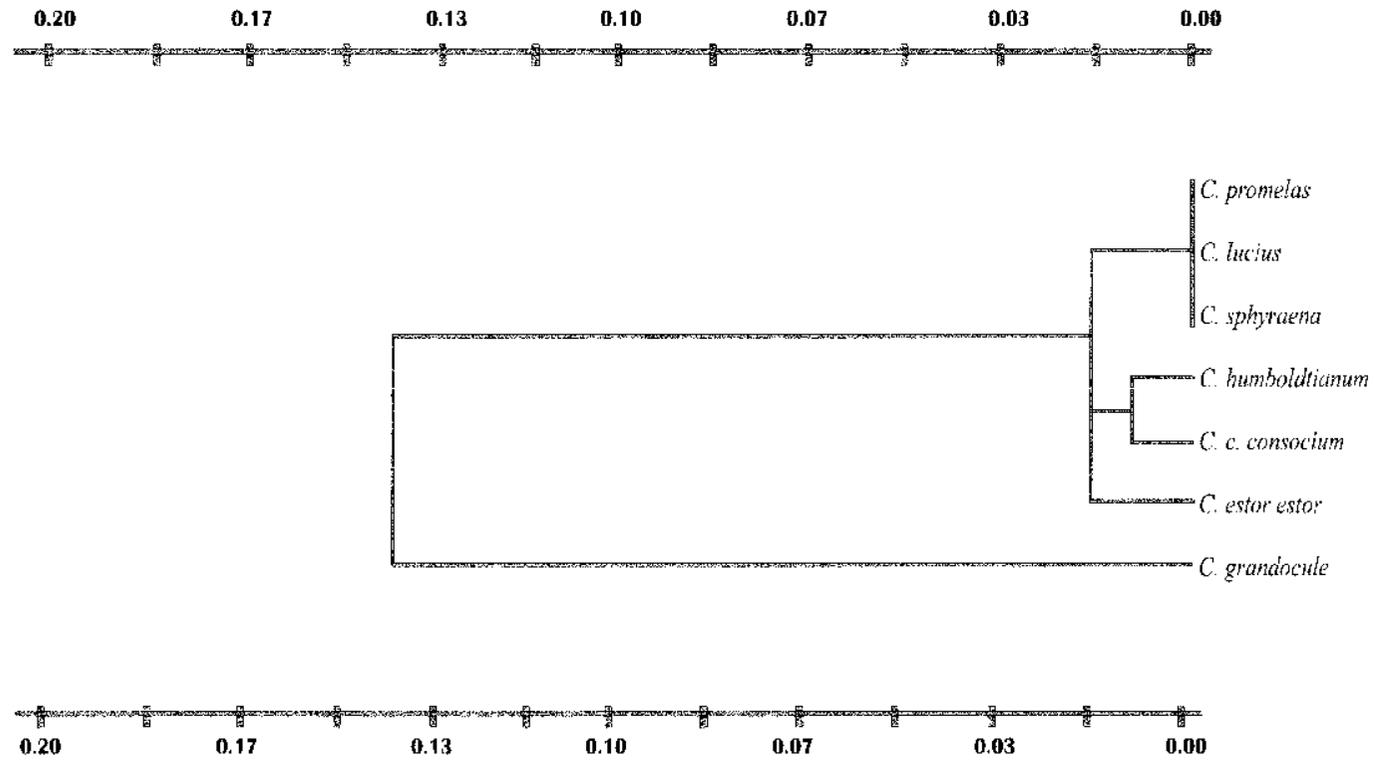


Figura 4. Dendrograma generado por UPGMA utilizando la Distancia mínima de Nei (1972) y en donde se agrupan las 7 especies: *C. estor estor*, *C. lucius*, *C. sphyraena*, *C. humboldtianum*, *C. consocium consocium*, *C. grandocule* y *C. promelas*.

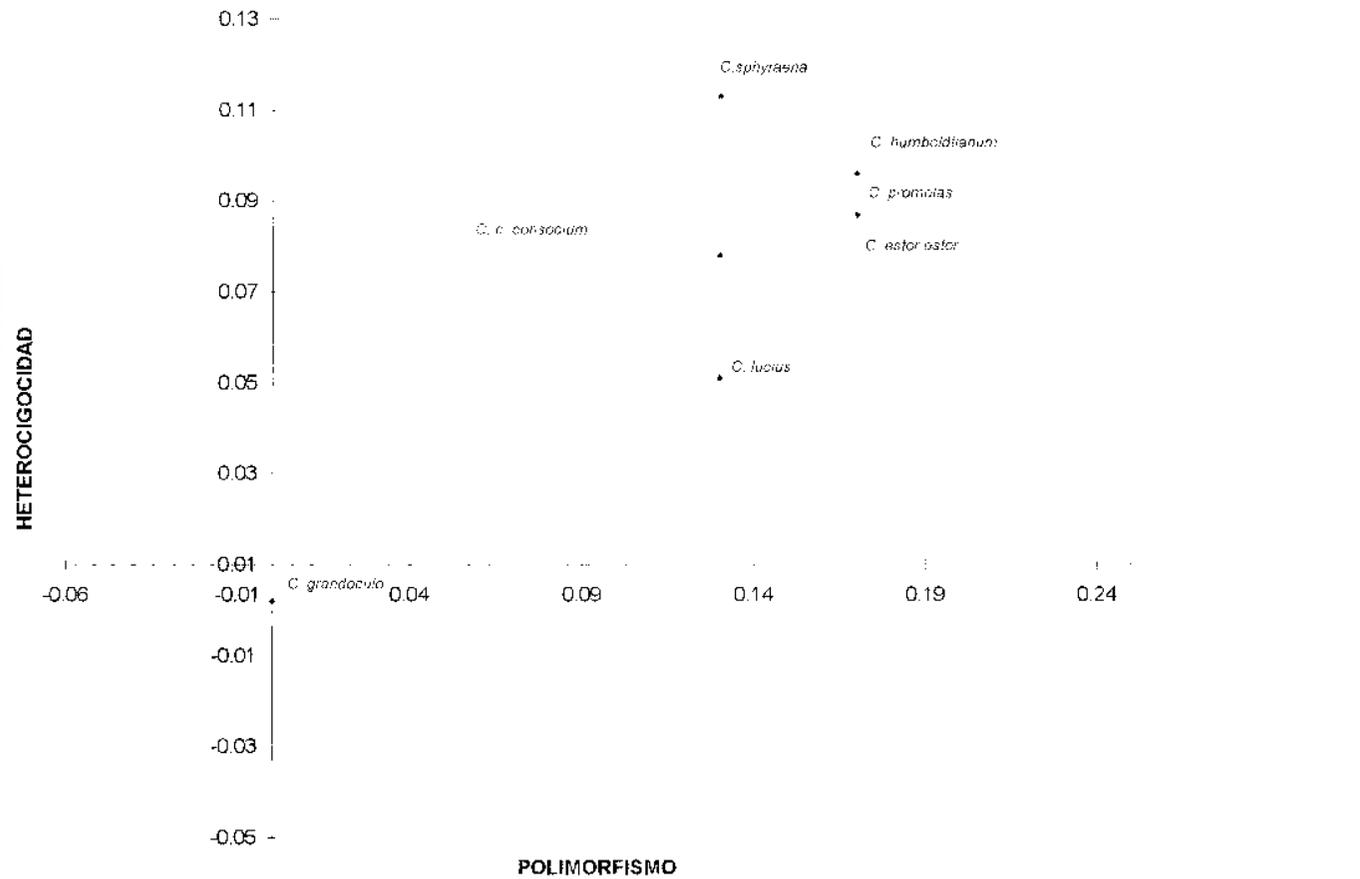


Figura 5. Gráfico en donde se muestra el polimorfismo (P) y heterocigocidad (Ho) observada de las siete especies estudiadas. *humboldtianum*, *C. prometas* y *C. esto ester*, presentan valores muy similares, mientras que *C. consocium consocium*, *C. lucius* y *C. sphyraena*, aunque presentan los mismos valores de P, presentan variabilidad en la Ho. *C. grandocula*, por su parte se encuentra muy lejos de los valores de todas las especies

<i>C.c.con</i>	D G H K G - I I T S - S R K P - R F M S L C S G M	22
<i>C.e.estor</i>	- E - S G - I I T S W - R - P P R F M S L C S G M	20
<i>C.c.con</i>	R S E R L V - Q Y E - - V D A D G S S K R L R L H	44
<i>C.e.estor</i>	R S E R L V V Q W W K - V D A D G S S K R L R L H	44
<i>C.c.con</i>	A C F E - E S S	51
<i>C.e.estor</i>	A C F W M E S S	52

Figura 6. Secuencias de amino ácidos (a. a) de las especies *C. consocium consocium* (*C. c. con*) y *C. estor estor* (*C.e.estor*). Se muestran las secuencias preliminares de 51 a.a para *C.c.con* y de 52 a.a para *C.e.estor*. Se muestran los a.a conservados (en negritas), y la "posibles" inserciones/delecciones (--).