

Informe final* del Proyecto L013

Estudio de la variabilidad genética de *Fundulus lima* y sus relaciones filogeográficas con otros fundúlidos (Pisces: Fundulidae) de la Península de Baja California, México

Responsable: M en C. Faustino Camarena Rosales
Institución: Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias
Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Dirección: Apartado Postal 1880, Ensenada, BC, 22800, México
Correo electrónico: camarena@faro.ens.uabc.mx
Teléfono/Fax: 01(61)74 4560
Fecha de inicio: Septiembre 30, 1997
Fecha de término: Mayo 14, 1999
Principales resultados: Informe final, Hojas de cálculo

Forma de citar el informe final y otros resultados:** Camarena Rosales, F. C., 2000. Estudio de la variabilidad genética de *Fundulus lima* y sus relaciones filogeográficas con otros fundúlidos (Pisces: Fundulidae) de la Península de Baja California, México. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L013.** México D. F.

Forma de citar hoja de cálculo: Camarena Rosales, F. C., 2000. Estudio de la variabilidad genética de *Fundulus lima* y sus relaciones filogeográficas con otros fundúlidos (Pisces: Fundulidae) de la Península de Baja California, México. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. L013.** México D. F.

Resumen:

En la península de Baja California, sobresale *Fundulus lima*, por ser una de las dos especies de peces dulceacuícolas endémicas conocidas, con distribución restringida a los oasis en la región de Comondú a San Ignacio. Dicha especie categorizada como amenazada, está relacionada con las subespecies de *Fundulus parvipinnis*, con distribución en la costa de Pacífico de la península. En el trabajo se busca analizar la variabilidad genética poblacional de *F. parvipinnis*, de la Península de Baja California, utilizando los métodos de electroforesis de alozimas y el RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) para ADN mitocondrial. La recolecta de los organismos se efectuará mediante muestreos con chichorro en: 1) estero de la misión (BC), para *Fundulus parvipinnis parvipinnis*; 2) Bahía Magdalena (BCS) para *Fundulus parvipinnis brevis* y 3) oasis de San Ignacio (BCS), para *Fundulus lima*. De las zonas de recolecta sobresale el oasis de San Ignacio, que es un hábitat reducido con impacto antropogénico (Grismer y McGuire, 1993), y estar dentro de la reserva del Vizcaíno. Por otro lado, Bahía Magdalena, es una zona de transición entre dos provincias biogeográficas costeras. En cada sitio se recolectará un lote de al menos 50 organismos, que se conservarán en congelación y otro lote de 50 organismos que se fijará con etanol. Con los ejemplares conservados en congelación, se aplicarán métodos de electroforesis en almidón para alozimas, probando 14 sistemas enzimáticos. Los datos se analizarán utilizando el paquete BYOSIS Y GENEPOP, que permiten determinar el grado de heterocogosis y el de similitud genética. De los organismos fijados en el alcohol se obtendrán algunas de las características diagnósticas, posteriormente se disecharán para obtener tejido muscular y se efectuará el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), probando 14 endonucleasas. Para el análisis de los datos se utilizarán paquetes computacionales como PHYLIP y REAP. El análisis de gabinete se realizará bajo el enfoque filogeográfico propuesto por Avise (1994). El apoyo solicitado será para efectuar una salida de recolecta, adquisición de materiales y reactivos de uso en el laboratorio y complemento al equipo existente en el laboratorio (incubadora con agitación rotacional)

-
- * 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.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
COMISION NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA
BIODIVERSIDAD

L013

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE *Fundulus lima* Y
SUS RELACIONES FILOGEOGRAFICAS CON OTROS
FUNDULIDOS (PISCES: FUNDULIDAE) DE LA PENINSULA DE
BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

INFORME FINAL

M. C. Faustino Camarena Rosales
Facultad de Ciencias (LGBM)

Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Facultad de Ciencias Marinas (LGBM)

Dr. Francisco Correa Sandoval
Instituto de Investigaciones
Oceanológicas
(Lab. de Genética y Acuicultura)

Dr. Gorgonio Ruiz Campos
Facultad de Ciencias (Lab. Vertebrados)

Ensenada, Baja California, Abril de 1999.

Resumen:

En la península de Baja California, sobresale *Fundulus lima*, por ser una de las dos especies ícticas dulceacuícolas endémicas, la cual tiene una distribución confinada a los oasis de Baja California Sur. Dicha especie está categorizada como amenazada y se relaciona filogenéticamente con *Fundulus parvipinnis*, una forma periférica distribuida en la vertiente Pacífico de la península.

En el presente trabajo se efectuó un análisis biométrico y se determinó la variabilidad genética poblacional de *F. lima* y de las subespecies de *F. parvipinnis*, utilizando métodos de electroforesis de alozimas, reportando los métodos estandarizados.

Los caracteres biométricos presentaron diferencias tan sutiles que son ineficientes para la categórica identificación de las especies y subespecies a partir de la morfología externa.

Con el análisis discriminante se obtuvo una clasificación adecuada de los organismos en tres grupos en más del 90% de los casos, los cuales corresponden a cada una de las poblaciones. Los caracteres que determinaron la función discriminante fueron para la raíz 1, los radios de la aleta dorsal (RD) y el número de escamas (ES) ($Y_1 = -0.4127 \text{ RD} + 1.7348 \text{ ES}$). La raíz 2 fue determinada por las proporciones morfométricas de la distancia postdorsal con la longitud patrón (DD), tamaño de la boca (BO) y diámetro ocular (OJ) con la longitud cefálica ($Y_2 = 0.4894 \text{ DD} + 0.5589 \text{ BO} - 0.5265 \text{ OJ}$). Las distancias de Mahalanobis presentaron valores altos entre las especies (15.83 *F. lima* vs. *F. p. parvipinnis* y 19.75 *F. lima* vs. *F. p. brevis*) y menores entre las subespecies de *F. parvipinnis* (7.26).

La variabilidad genética promedio observada en las subespecies de *F. parvipinnis*, se encuentra dentro de los intervalos conocidos para otros peces. La especie de *F. lima* mostró menores niveles de variabilidad genética en comparación con *F. parvipinnis*, con el mismo patrón en el porcentaje de loci polimórficos (18.8 *F. lima* vs 25.0 en *F. parvipinnis* sspp.) como en la heterocigosis observada (0.039 *F. lima* vs 0.128 en *F. p. brevis* y 0.137 en *F. p. parvipinnis*).

Con base en la distancia genética de Nei, los mayores valores se registraron entre *F. lima* y *F. p. parvipinnis* ($D = 0.247$). *F. lima* resultó menos distante de *F. p. brevis* ($D = 0.153$). La distancia entre las subespecies fue relativamente baja ($D = 0.075$), y el promedio entre especies (las subespecies de *F. parvipinnis* combinadas vs. *F. lima*) fue de 0.200.

Los resultados aportan evidencias en apoyo al origen evolutivo y biogeográfico de los fundúlidos peninsulares, así como del estatus nomenclatorial. Se propone que la dispersión de *F. parvipinnis*, en dirección norte a sur, a través de un gradiente ambiental que resultó en un proceso de diferenciación parapátrico, originándose las subespecies *F. p. parvipinnis* y *F. p. brevis*. La especie *F. lima* se originó a partir de la migración vía fluvial de algunos organismos de *F. parvipinnis*, resultando una especiación alopátrica vicariante.

La variabilidad genética de *F. lima* resultó baja, la cual se asocia principalmente a un efecto de la fragmentación y reducción de sus poblaciones. Desde esta perspectiva, se recomienda: (1) recategorizar el estado de conservación de *F. lima* al de riesgo moderado de extinción, (2) incluir el Oasis de San Ignacio como una zona de resguardo y conservación de germoplasma endémico, (3) prohibir la introducción de especies exóticas en dicha cuenca hidrológica, (4) seleccionar organismos para conservación *ex situ*, y (5)

efectuar trabajos de difusión en la región con temas relacionados con esta especie endémica.

Resumen del tipo de análisis:

La recolecta del material íctico se efectuó con un chinchorro en las siguientes localidades: Boca del Arroyo La Misión (B.C.), para *Fundulus parvipinnis*; Bahía Magdalena (B.C.S.) para *Fundulus parvipinnis brevis*; y oasis de San Ignacio (B.C.S.) para *Fundulus lima*. Para el análisis biométrico se tomó una submuestra de 50 organismos de cada taxón y para el análisis de alozimas se tomó una segunda submuestra de 45 organismos de cada taxón.

Para el análisis biométrico se cuantificaron 16 caracteres morfométricos y merísticos. Los datos se procesaron con el programa STATISTICA ver. 4.2, mediante el cual se efectuó un análisis exploratorio y, considerando 15 variables merísticas y proporciones morfométricas, las cuales fueron sujetas a un análisis de función discriminante por el método de retroescalonado, para identificar los caracteres diagnósticos. Con base en las distancias cuadradas de Malahanobis se construyó un dendrograma.

Para el análisis alozímico, se procedió a trabajar exclusivamente con la musculatura axial, la cual fue homogeneizada individualmente. El procesamiento electroforético se efectuó colocando intercaladamente las muestras de las diferentes poblaciones. Para los análisis de alozimas fueron seleccionados 12 sistemas, en los cuales se reconocieron 16 loci.

Los datos obtenidos directamente de los zimogramas fueron analizados con el programa BIOSYS-1 estimándose el polimorfismo, la diversidad genética (heterocigosis esperada de Nei, 1978), el equilibrio de Hardy Weinberg (mediante la prueba de Ji-cuadrada), y la distancia genética entre poblaciones (Nei, 1978). Con base en el algoritmo UPGMA se construyó un dendrograma de las distancias genéticas.

Asimismo, mediante el programa GENEPOP ver. 1.0, se analizaron las frecuencias fenotípicas entre las tres poblaciones mediante la prueba F (Wright, 1965), en pruebas pareadas, obteniendo los respectivos valores de significancia.

Finalmente, el análisis de resultados se efectuó desde una perspectiva de la biogeografía histórica para proponer una reconstrucción filogeográfica de la evolución de los fundúlidos peninsulares.

Con lo anterior se obtuvo información de la variabilidad genética de *F. lima*, como un estado de conservación de la especie, brindando elementos para el manejo del recurso.

Resumen de las principales conclusiones:

- › Con base en los resultados se brindan argumentos significativos a favor de la separación taxonómica de las especies y subespecies de fundúlidos peninsulares. Probablemente su dispersión a lo largo de las costas de Pacífico se inició desde su centro de origen en el Estado de California (EE.UU.), durante el Pleistoceno.
- › La dispersión de *F. parvipinnis* dentro de un gradiente ambiental, en dirección nortesur, provocó un proceso parcial de especiación parapátrica con subsecuente aislamiento genético, originando así las actuales subespecies *F. p. parvipinnis* y *F. p. brevis*.
- › La especie de *F. lima* se originó a partir de la migración de algunos organismos de *F. parvipinnis* vía fluvial hasta los actuales oasis, y resultante de una especiación alopátrica vicariante.
- › La menor variabilidad genética de *F. lima*, esta principalmente asociada a la fragmentación y reducción de sus poblaciones y su concomitante deriva génica.
- › En conclusión se recomienda: (1) Recategorizar el estado de conservación de *F. lima*, de amenazada por el de riesgo moderado de extinción; (2) Incluir al Oasis de San Ignacio dentro de las zonas de protección especial de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno, como un área de resguardo y conservación de germoplasma endémico; (3) Prohibir la introducción de especies exóticas en la cuenca hidrológica de San Ignacio y en otras adyacentes; (4) Realizar una selección de organismos de *F. lima* para destinarlos a sistemas de cultivo *ex situ* en apoyo a los programas de conservación de este recurso; y (5) Efectuar trabajos de difusión acerca de esta especie, dirigidos a los habitantes de la región.
- › De los resultados obtenidos se presenta una base de datos relacionada con el estudio poblacional de *F. lima* y de las subespecies de *F. parvipinnis*.
- › En una sección se presentan los métodos estandarizados de laboratorio.

Resumen ejecutivo:

La recolecta del material íctico se efectuó con un chinchorro (6m x 1.5 m x 1/8") en las siguientes localidades: Boca del Arroyo La Misión (B.C.) para *Fundulus parvipinnis parvipinnis* (noviembre de 1997); Bahía Magdalena (B.C.S.) para *Fundulus parvipinnis brevis* (diciembre de 1997), y oasis de San Ignacio (B.C.S.) para *Fundulus lima* (diciembre de 1997). Para el análisis biométrico se tomó una submuestra de 50 organismos de cada taxón y para el análisis de alozimas se tomó una segunda submuestra de 45 organismos de cada taxón.

Análisis biométrico

Para el análisis biométrico se cuantificaron 16 caracteres anatómicos megamórficos: Longitud total; Longitud patrón; Longitud cefálica; tamaño de la boca; Distancia preorbital; Diámetro ocular; Distancia postocular; Distancia predorsal; ancho de la dorsal; Distancia postdorsal; Distancia postanal; Altura máxima; Radios de la dorsal; Radios de la caudal; Radios de la anal; Escamas en la serie lateral.

Los datos biométricos se procesaron con el programa STATISTICA ver. 4.2. De las características merísticas examinadas, el número de escamas de la serie lateral destacó como un carácter de separación entre las especies de fundúlidos peninsulares, al tener *F. lima* una mayor mediana ($M=36$) que *F. parvipinnis* ($M=34$).

En cada taxón, cada carácter morfométrico fue correlacionado con la longitud patrón, resultando en todos los caracteres analizados altos valores de correlación e indicando isometría con la talla.

Para efectuar el análisis discriminante se utilizaron proporciones de las medidas morfométricas, las cuales no presentaron correlaciones significativa, con lo anterior, se eliminó el efecto de redundancia de las variables y la clasificación (discriminación) dependió exclusivamente de las diferencias entre las poblaciones.

Con el análisis discriminante se obtuvo una clasificación adecuada de los organismos en tres grupos, los cuales corresponden a cada una de las poblaciones estudiadas. Los caracteres de mayor importancia ($p \{ 0.001$) para la clasificación de estos grupos fueron: radios de las aletas dorsal y caudal, escamas de la serie longitudinal, proporciones de la distancia postdorsal sobre la longitud patrón, tamaño de la boca sobre la longitud cefálica y diámetro ocular sobre la longitud cefálica.

La raíz 1 obtenida del análisis discriminante, fue determinada por los radios de la aleta dorsal (RD) y el número de escamas (ES) ($Y_1 = -0.4127 RD + 1.7348 ES$), en contraste la raíz 2 por las proporciones morfométricas de la distancia postdorsal con la longitud patrón (DD), tamaño de la boca (BO) y diámetro ocular (OJ) con la longitud cefálica ($Y_2 = 0.4894 DD + 0.5589 BO - 0.5265 OJ$). El modelo obtenido por el análisis de función discriminante resultó eficiente, ya que clasificó más del 90% de los organismos adecuadamente (Gráfica 1).

En la matriz de distancias de Mahalanobis se observaron valores mayores entre la separación de especies y menor es entre las subespecies, lo cual permitió inferir relaciones entre los grupos resultantes (Gráfica 2).

Todos los caracteres biométricos utilizados presentaron diferencias tan sutiles que son ineficientes para la categórica identificación de las especies y subespecies a partir de la morfología externa. Las diferencias en la morfología externa van de poco sutiles entre las

En el presente trabajo, los resultados muestran baja homogeneidad entre las poblaciones y con estructuración independiente ($F_{st} = 0.6077$).

Con base en la distancia genética de Nei, la mayor distancia se registró entre *F. lima* y *F. p. parvipinnis* ($D = 0.247$). *F. lima* resultó menos disímil o distante de *F. p. brevis* ($D = 0.153$). La distancia entre las subespecies fue relativamente baja ($D = 0.075$), y el promedio entre especies (las subespecies de *F. parvipinnis* combinadas vs. *F. lima*) fue de 0.200. Las distancias genéticas y la relación entre grupos se ilustra en un dendrograma (Gráfica 2).

La relativa cercanía geográfica entre las poblaciones de *F. lima* y aquellas de *F. p. brevis* de Bahía Magdalena (B.C.S.), permite suponer una menor distancia genética entre ellas, en comparación con las poblaciones de *F. p. parvipinnis*. Esta relación es coherente con nuestros resultados, ya que la distancia de *F. lima* con *F. p. parvipinnis* ($D = 0.247$) es mayor que la observada entre *F. lima* con *F. p. brevis* ($D = 0.153$). Asimismo, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *F. lima* derivó de *F. p. brevis*.

Con base en los resultados de la varianza estandarizada y en las distancias genéticas, se ratifica la validez taxonómica de *F. p. parvipinnis*, *F. p. brevis*, *F. lima*.

Evolución de los fundúlidos peninsulares.

Para evaluar la contundencia en la separación de los fundúlidos se estimó el tiempo de origen y divergencia de las poblaciones con el modelo de Nei (1987) de $t = k D$, el cual se aplicó como una aproximación basada en valores generales.

La divergencia de *F. lima* se ubicó a mediados del Pleistoceno, y la divergencia entre las subespecies de *F. parvipinnis* a finales del Pleistoceno (Gráfica 3). Desde esa época la península de Baja California presentaba una fisiografía similar a la actual.

Para explicar el origen y dispersión de los fundúlidos peninsulares se plantea como hipótesis que el centro de dispersión se ubicó en la parte norte de su distribución actual, durante el Pleistoceno. En este caso, *F. p. parvipinnis* se relacionaría con el linaje más antiguo.

Supongamos que la dispersión de la especie ancestral de *F. parvipinnis* tuvo la misma dirección que la Corriente de California, la cual tiene su límite más sureño en Bahía Magdalena, B.C.S. La gradación ambiental permitió la formación de una clina y la consecuente derivación de la subespecie de *F. p. brevis*, mediante un proceso parapátrico.

La formación de la especie de *F. lima* podría ser relativamente reciente a partir de organismos de *F. parvipinnis* que penetraron continentalmente vía fluvial, durante las lluvias continuas caracterizaron el Pleistoceno, estableciéndose en los oasis actuales.

En este escenario, la baja variabilidad genética encontrada en *F. lima* esta relacionada, al menos, con un efecto de la fragmentación de la población y reducción en el tamaño poblacional. Si suponemos una población ancestral de *F. lima* fragmentándose paulatinamente en subpoblaciones en los diferentes oasis, las cuales no fueron genéticamente representativas de la población original, se esperaría una reducción en la variabilidad genética. A favor de este supuesto, la distribución actual de *F. lima* en las distintas cuencas hidrológicas (oasis) se encuentra fragmentada.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se brindan argumentos significativos a favor de la separación taxonómica de las especies y subespecies de fundúlidos peninsulares. Probablemente su dispersión a lo largo de las costas de Pacífico se

subespecies a relativamente marcadas entre las especies, siendo éstas coherentes con los esquemas de distancias aquí obtenidos de las relaciones entre los fundúlidos peninsulares.

Análisis alozímico.

Para el análisis alozímico, se procedió a trabajar exclusivamente con la musculatura axial, ya que se observó en la cavidad corporal e hígado de *F. lima* una alta incidencia (82.20 %) de nemátodos parásitos (*Contraecaecum multipapillatum*). Los tejidos elegidos se homogeneizaron individualmente, con un homogeneizador eléctrico. Las muestras se procesaron mediante electroforésis, la que se efectuó colocando intercaladamente las muestras de las diferentes poblaciones. Para los análisis de alozimas fueron seleccionados 12 sistemas, en los cuales se reconocieron 16 loci.

De los 16 loci analizados, nueve fueron monomórficos en las tres poblaciones (*Mpi*, *G6pd*, *Me-1*, *Me-2*, *Ldh*, *Idh*, *Gadp*, *Pt-3* y *Aat-1*), dos fueron monomórficos intrapoblacionalmente, pero polimórficos interpoblacionalmente (*Pt-2* y *Aat-2*), uno fue monomórfico en *F. lima*, pero polimórfico en los otros fundúlidos (*Pgm*), y cuatro fueron polimórficos en las tres poblaciones (*Est-2*, *PepB*, *Mdh-1* y *Mdh-2*). Dos loci resultaron de gran valor en la identificación de fundúlidos peninsulares, *Aat-2* y *Pt-2*, los cuales a pesar de ser monomórficos intrapoblacionalmente, presentaron diferentes alelos fijados entre las especies y subespecies. Esta condición permite aquí considerarlos como marcadores bioquímicos de valor taxonómico.

La variabilidad genética promedio observada (0.128 y 0.137) en las subespecies de *F. parvipinnis*, se encuentra dentro de los intervalos conocidos (0.05 y 0.17) para otros peces.

La especie de *F. lima* mostró menores niveles de variabilidad genética en comparación con las subespecies de *F. parvipinnis* (Tabla 1). El mismo patrón fue observado en el porcentaje de loci polimórficos (18.8 vs 25.0) como en la heterocigosis observada (0.039 vs 0.128 en *F. parvipinnis brevis* y 0.137 en *F. parvipinnis parvipinnis*). Los bajos valores de variabilidad genética en *F. lima* pueden ser atribuido, al menos, al efecto de la fragmentación y reducción del tamaño de la población.

Tabla 1. Resumen de la variación genética de los fundúlidos de la península de Baja California. La desviación estándar se indica entre paréntesis. *Criterio $P \leq 0.05$.

	<i>F. lima</i>	<i>F. p. brevis</i>	<i>F. p. parvipinnis</i>
Localidad	Oasis de San Ignacio B.C.S.	Bahía Magdalena, B.C.S.	Boca del Arroyo de la Misión, B.C.
Tamaño de la muestra promedio por locus	41.1 (1.3)	43.1 (0.7)	42.3 (1.0)
Número de alelos por locus	1.3 (0.1)	1.4 (0.2)	1.4 (0.2)
Número de loci polimórficos	6	7	7
Porcentaje de loci polimórficos*	18.8	25.0	25.0
Heterocigosis promedio			
Observada	0.039 (0.023)	0.128 (0.069)	0.137 (0.082)
Esperada	0.060 (0.036)	0.099 (0.045)	0.089 (0.043)

La varianza estandarizada (F de Wright) registrada entre las poblaciones ($F_{st} = 0.60775$), implica la presencia de una estructura. Pruebas pareadas entre las subespecies (*F. p. parvipinnis* vs. *F. p. brevis*), arrojaron un valor de F de Wright relativamente bajo ($F_{st} = 0.4122$) con respecto al contraste entre especies (*F. lima* vs. *F. p. brevis*, $F_{st} = 0.6168$; y *F. lima* vs. *F. p. parvipinnis* $F_{st} = 0.7311$). Estos resultados confieren evidencias de la estrecha relación entre *F. lima* y *F. p. brevis*, cuyas poblaciones son geográficamente vecinas.

inició a partir de un centro de origen en el estado de California (EE.UU.), durante el Pleistoceno.

La dispersión de *F. parvipinnis*, en dirección norte-sur, dentro de un gradiente ambiental, provocó un proceso parcial de especiación parapátrica con subsecuente aislamiento genético, originando así las actuales subespecies *F. p. parvipinnis* y *F. p. brevis*.

La especie de *F. lima* se originó a partir de la migración de algunos organismos de *F. parvipinnis* vía fluvial hasta los actuales oasis, resultando de una especiación alopátrica vicariante. La menor variabilidad genética que presenta *F. lima*, se relaciona principalmente con la fragmentación y reducción de sus poblaciones con su concomitante deriva génica.

Propuesta de manejo.

El estado de conservación de *F. parvipinnis* es considerado como estable (Ruiz-Campos *et al.*, 1998a). Para su manejo como carnada viva presenta diversas ventajas, tales como alta tolerancia a las variaciones ambientales como temperatura y salinidad, lo que permite un relativo fácil transporte y mantenimiento temporal. Por lo anterior, se recomienda efectuar de estudios tendientes a la explotación racional del recurso, donde se establezcan tasas y época de captura.

La especie *F. lima* presenta baja variabilidad genética, la cual aunada a la disminución de sus poblaciones naturales por efecto de la reducción del hábitat, introducción de peces exóticos y otros impactos antropogénicos, se ha sugerido considerarla en riesgo moderado de extinción (Ruiz-Campos *et al.*, 1998b).

La baja variabilidad genética tiene un efecto en la probabilidad que determina la persistencia de la especie, incrementándose la susceptibilidad a diversos efectos genéticos, como la endogamia, pérdida de flexibilidad evolutiva y depresión por hibridación. Un tamaño poblacional reducido con baja variabilidad genética está asociado a fluctuaciones demográficas, declinaciones súbitas en números y extinciones locales.

Para determinar la evolución de los riesgos que tiene una población con estas características, se recomienda el monitoreo en el tiempo de la variabilidad, lo que adicionalmente brindaría una mayor información sobre los factores causales y consecuencias de la baja variabilidad.

En síntesis se recomienda: (1) Recategorizar el estado de conservación de *F. lima*, de amenazada por el de riesgo moderado de extinción; (2) Incluir al Oasis de San Ignacio dentro de las zonas de protección especial de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno, como un área de resguardo y conservación de germoplasma endémico; (3) Prohibir la introducción de especies exóticas en la cuenca hidrológica de San Ignacio y en otras adyacentes; (4) Realizar una selección de organismos de *F. lima* para destinarlos a sistemas de cultivo *ex situ* en apoyo a los programas de conservación de este recurso; y (5) Efectuar trabajos de difusión acerca de esta especie, dirigidos a la poblaciones de la región.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) a través del proyecto L013 “Estudio de la variabilidad genética de *Fundulus lima* y sus relaciones filogeográficas con otros fundúlidos (Pisces: Fundulidae) de la península de Baja California”, el apoyo en instalaciones y logístico de la Universidad Autónoma de Baja California en las unidades académicas Facultad de Ciencias, Facultad de Ciencias Marinas y del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

Uno de los autores (F. Camarena), recibió apoyo a través del programa de becas PROMEP y SUPERA de la Secretaría de Educación Pública, para la realización de estudios doctorales.

En el trabajo participaron a través de programas de becarios de apoyo y servicio social los estudiantes de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias: Victor Anguiano, Javier Flores (trabajo de campo), Isela Pérez (estandarización de métodos en alozimas), José Zavala y Mónica Castellanos (Lab. Biología Molecular).

A lo largo de la investigación también se contó con el apoyo de M.C. Miguel Cervantes, M.C. Luis Enriquez y Ocean. Mariana Jacome.

L013 Estudio de la variabilidad genética de *Fundulus lima* y sus relaciones filogeográficas con otros fundúlidos (Pisces: Fundulidae) de la Península de Baja California, México.

Introducción:

Dos especies de la familia Fundulidae (Parenti, 1981) habitan la vertiente Pacífico de la península de Baja California, México (Figura 1). La primera, *Fundulus lima* (Vaillant, 1894) está continentalmente confinada a los oasis entre San Ignacio y San Luis Gonzaga, Baja California Sur (BCS) (Ruiz-Campos y Contreras-Balderas, 1987; Reynoso-Mendoza, 1994), y es categorizada como amenazada (SEDUE, 1994); y la segunda, *Fundulus parvipinnis*, con dos subespecies eurihalinas y de concurrencia esporádica en arroyos: *F. parvipinnis parvipinnis* (Osburn y Nichols, 1916) distribuida de Monterey, California (EE.UU.) a Guerrero Negro, B.C.S. (Follett, 1960; De la Cruz-Agüero *et al.*, 1996); y *F. parvipinnis brevis*, la cual es restringida a Bahía Magdalena, B.C.S. (Follett, 1960).

Estos fundúlidos peninsulares exhiben diferencias morfológicas sutiles, cuya distinción ha sido basada principalmente en sus ámbitos de distribución geográfica. Los caracteres que permiten distinguir a esas especies son: la proporción del diámetro ocular respecto a la longitud cefálica y la presencia de aletas muy desarrolladas en los machos de *F. lima* durante la época de cortejo (Tabla 1).

Myers (1930) verificó a las subespecies de *F. parvipinnis* con los organismos de la serie tipo, argumentando que algunos individuos de *F. p. brevis* no pudieron ser diferenciados de *F. p. parvipinnis*. El reconocimiento diagnóstico con caracteres morfológicos externos se fundamenta en el intervalo del número de escamas en la serie longitudinal y en el número de vértebras (Tabla 1).

Por su similitud morfológica y distribución geográfica cercana, *F. lima* y *F. parvipinnis* se consideran estrechamente relacionados (Follett, 1960). Recientemente a partir de secuencias del citocromo *b* se infirió un origen monofilético de ambos taxa, además se postuló la hipótesis de que los fundúlidos de la costa Este de Norteamérica se dispersaron hacia la costa del Pacífico a través de Panamá antes de la formación del istmo, a principios del Plioceno (Bernardi y Powers, 1995).

En referencia a los métodos de trabajo, el análisis de alozimas ha permitido resolver controversias en la sistemática de peces a nivel intraespecífico de algunos grupos (Avise, 1974) y de especies estrechamente relacionadas (Park y Moran, 1994), así como definir o rectificar nuevas especies y subespecies (Ayala, 1975). También ha contribuido a fundamentar las relaciones filogenéticas entre grupos (Avise, 1994) o bien en el reconocimiento de poblaciones (Grijalva-Chon *et al.*, 1996) y especies (Grant *et al.*, 1980). Entre la información que brinda, se muestran los niveles de divergencia entre grupos (Avise, 1974).

Los estudios alozímicos del género *Fundulus* han sido limitados a unas pocas especies de la costa Atlántica de Norteamérica (Cashner *et al.*, 1992), restringiéndose sus análisis a un simple locus (Cashner *et al.*, 1992; Mitton, 1993), a diferentes poblaciones de una especie (DiMichele *et al.*, 1986; Powers *et al.*, 1991), o bien a una reducida cantidad de organismos (Grady *et al.*, 1990).

Con la intención de tener un enfoque adicional de la variabilidad genética de los fundúlidos, se procuró en el presente proyecto generar información a partir de RFLP de ADN mitocondrial, con resultados negativos, debido a la limitada cantidad del tejido y a su baja calidad para obtener ADN mitocondrial. Las experiencias generadas al respecto se presentan en el anexo 4.

Asimismo, el presente trabajo aporta evidencias biométricas y de variación alozímica en apoyo al origen evolutivo y biogeográfico de los fundúlidos costeros (*F. parvipinnis* sspp.) y continentales (*F. lima*) de la península de Baja California, así como en el estatus nomenclatorial.

Antecedentes

La ictiofauna de aguas continentales a nivel mundial está compuesta principalmente por peces dulceacuícolas de origen primario y el remanente tiene un origen secundario (Myers, 1951). Los peces de origen secundario vicario tienen la capacidad de cruzar pequeñas barreras de salinidad (Myers, 1951). Asimismo, los peces secundarios son de valor biogeográfico por ser indicadores de antiguas conexiones hidrológicas (Lagler *et al.*, 1990).

La especie dulceacuícola, *F. lima*, es considerada de origen vicario (Miller, 1958), la cual derivó de ancestros marinos.

Para la ictiofauna de la península de Baja California, Follett (1960) enlistó 17 familias, 25 géneros y 29 especies, siendo *F. lima* la única endémica. Posteriormente, Ruiz-Campos y Contreras-Balderas (1987) incrementaron la lista a 59 especies, de las cuales 21 son exóticas y 38 son nativas, agrupando a *F. parvipinnis* dentro de las nativas.

De las especies de familia Fundulidae se han estudiado ampliamente las que habitan la cuenca Atlántica de Norteamérica, no obstante las especies del Pacífico son poco conocidas (Cashner *et al*, 1991).

Bernardi y Powers (1995) establecieron las relaciones filogenéticas de los fundúlidos del Pacífico con otras especies del género *Fundulus*, basándose en la secuencia del gene del citocromo *B*; apoyando un origen monofilético, pero se encontró que *F. parvipinnis* y *F. lima* son significativamente divergentes del género. Debido a que dicho análisis fue restringido a una sola muestra, éste no puede considerarse representativo en el contexto de la estructura genética poblacional.

El género *Fundulus* fue incluido anteriormente en la subfamilia Fundulinae, de la familia Cyprinodontidae (Myers, 1951). Posteriormente a la subfamilia Fundulinae se le confiereió el estatus de familia (Fundulidae), en la cual se incluyeron 5 géneros: *Adinia*, *Fundulus*, *Lucania*, *Leptolucania* y *Plancterus*, distribuidos en Norte y Centro América, incluyendo Cuba y Las Bermudas (Parenti, 1981).

Wiley (1986) considerando las características morfológicas, propuso las relaciones evolutivas del género *Fundulus*, agrupó a las especies en cuatro subgéneros, con excepción de *F. lima* y *F. parvipinnis*, a las cuales las consideró significativamente distintas con respecto al resto de especies analizadas.

Con base en estudios morfológicos, estas especies se agruparon posteriormente dentro del subgénero monofilético *Xenisma*, aunque las sinamorfías para apoyar al subgénero aun no se han aportado (Cashner *et al.*, 1992).

Para las especies de *Fundulus* de la vertiente del Pacífico, se han efectuado estudios taxonómicos y de distribución (Jordan y Everman, 1896-1900; Evermann, 1908; Myers,

1927 y 1930; Reynoso-Mendoza, 1994; Ruiz-Campos y Alaniz-García, 1995, Ruiz-Campos *et al.*, 1998a; Ruiz-Campos *et al.*, 1998b). En el anexo 1 se presentan las características diagnósticas de los fundúlidos del Pacífico.

Organismos de *F. lima* (Figura 2) son conocidos como “Baja Killifish” o “sardinilla de la península” (Mayden *et al.*, 1992). Los hábitos y la relación trófica de este pez endémico fueron estudiados en el oasis de San Ignacio, donde se cuantificó un traslape alimenticio significativo con el pecílido exótico *Xiphophorus helleri* (Alaníz-García, 1995).

Por otro lado, se han efectuado observaciones de su comportamiento reproductivo, donde se indica que las ctenas de sus escamas funcionan como estructuras de contacto en los machos, con las cuales el macho “frota” a la hembra durante la cópula (Brill, 1982).

En cuanto a *F. parvipinnis* (Figura 3), también conocido como “California Killifish” (Mayden *et al.*, 1992) o guayacon (Cabrera-Santillan, 1997), se considera estable su estado de conservación (Ruiz-Campos *et al.*, 1998b).

En referencia a la ecología del guayacon se han efectuado descripciones para las aguas continentales de California (Miller, 1939; Moyle, 1976) y en los arroyos costeros del noroeste de Baja California (Miller, 1943; Ruiz-Campos *et al.*, 1998b) así como de diversas localidades costeras en México, como lagunas Ojo de Liebre y de Guerrero Negro (De la Cruz-Agüero *et al.*, 1996).

La época de reproducción de *F. parvipinnis* en California se estableció entre los meses de abril a Mayo (Fritz, 1975). Para la península de Baja California, Ruiz-Campos *et al.* (1998b) describió organismos con coloración nupcial entre los meses de febrero a agosto, y la presencia de organismos sexualmente activos entre abril y mayo.

Area de estudio

La península de Baja California ha presentado una fuerte transformación geológica a partir del Cretácico. En dicho periodo la actual península Baja Californiana se encontraba unida al macizo continental, y estaba en su mayor parte sumergida (López, 1982).

En la porción central de la península existen evidencias de las condiciones del Eoceno. La formación de Bateques, ubicada a unos 50 km del Oasis de San Ignacio, contiene fauna de

macrofósiles que indican condiciones marinas costeras con aguas cálidas, con evidencias de elementos faunales del Mar de Tethys (Squires y Demetron, 1992)

Posteriormente, según el modelo geodinámico propuesto por Dickinson (Dickinson, 1977), la placa del Farallón, la cual fue subyacente del Vizcaíno, produjo por subducción el levantamiento de la región desde el Cretácico hasta el Paleoceno, intensificándose durante el Oligoceno, con un alto grado de erosión.

Al finalizar la subducción en el Mioceno medio y superior se formó el protogolfo de California, al separarse la península del macizo continental. En el Mioceno y Plioceno continua la dinámica de apertura del Golfo de California. La emersión final de la península sobre el nivel del mar, ocurrió después del Mioceno como una consecuencia del surgimiento del complejo volcánico San Andrés-Cedros, al Oeste de la Región del Vizcaíno, así como por el empuje de la cuenca neógena de Santa Rosalía (Padilla *et al.*, 1998).

En el Cuaternario, la parte central de la península (Santa Rosalía) se elevó por levantamiento del bloque de California y por efectos locales vía evolución magmática de la caldera La Reforma. Durante el Pleistoceno y principios de Holoceno la presencia del batolito peninsular y la Sierra la Giganta delimitaron el contorno peninsular actual (Padilla *et al.*, 1998).

Las condiciones hidrológicas han variado durante la evolución histórica de la península. La parte central peninsular durante el Cuaternario presentó una fuerte transformación, de un área mesófila a una xerófila con biota de afinidad árida (Grismer y McGuire, 1993).

Con base en evidencias fósiles y sedimentológicas se considera que esta región presentó a principios del Cuaternario lluvias torrenciales biestacionales, de tipo monzónico en verano y precipitaciones intensas en invierno; posteriormente en el Wisconsiniano ocurrió la última glaciación completa y, en el Holoceno, disminuyó gradualmente la lluvia torrencial hasta tener las condiciones climáticas áridas actuales de esta región (Van Devender *et al.*, 1987).

De los sistemas peninsulares destacan los oasis por presentar comunidades relictas de origen mesófilo, como reptiles y anfibios, rodeados por comunidades xerófilas (Grismer y

McGuire, 1993). El Oasis de San Ignacio es la localidad tipo de *F. lima*. Este biotopo es considerado un hábitat reducido y aparentemente con impacto antropogénico (Grismer y McGuire, 1993). Se encuentra dentro de la reserva de la biosfera del Vizcaíno y, en consecuencia, sujeta a regulaciones en cuanto al manejo de sus recursos (Breceda *et al.*, 1991).

El cuerpo de agua tiene un ancho promedio de 15 a 20 m y una longitud de aproximadamente 2 km, siendo éste dividido por un puente que conduce al poblado de San Ignacio. El agua del oasis tiene temperatura cálidas en el intervalo de 29°C (manantial) a los 23°C, con ligeras variaciones anuales (Alaniz-García, 1995; Ruiz-Campos y Alaniz-García, 1995).

La ictiofauna del oasis está representada por una especie endémica (*F. lima*) y tres especies exóticas (*Xiphophorus hellerii*, *Poecilia reticulata* y *Cyprinus carpio*). Un alto traslape alimenticio es registrado entre *F. lima* y *X. hellerii* (Alaniz-García, 1995).

En cuanto a la zona costera de la península de Baja California, en la porción noroeste se encuentra la Provincia biogeográfica Californiana, que va desde Conception Point, California, EE.UU. (34°30' latitud norte) hasta Punta Eugenia, B.C.S. (28° latitud norte), al suroeste inicia la Provincia Mexicana (23° latitud norte) y en área intermedia, una amplia zona de transición entre estas provincias (28° a 23° latitud norte) (Briggs, 1974). Los fundúlidos costeros habitan en sistemas costeros de la Provincia Californiana y en la zona de transición con la Provincia Mexicana. No se cuentan con registros costeros entre Bahía Magdalena y Guerrero Negro (B.C.S.), que es la región norte de la zona de transición (Figura 4).

Aproximadamente en la porción central de la provincia Californiana se encuentra el Estero del Arroyo La Misión, también conocido como Boca del Arroyo Guadalupe. En esta localidad, *F. p. parvipinnis* es un residente permanente. El estero presenta fluctuaciones en las condiciones ambientales por el efecto del cierre de la boca durante diferentes épocas, presentándose la entrada de agua marina en forma temporal (Cabrera-Santillan, 1977).

En la zona de transición, entre las provincias Californiana y Mexicana, se encuentra Bahía Magdalena, que es la localidad tipo de *F. p. brevis* y además el sitio más sureño de la

distribución del género *Fundulus* (Follett, 1960). Esta bahía contiene especies de origen en las provincias Californiana, Panámica, Corteziana y Mexicana (Briggs, 1974).

Hipótesis.

Las especies *F. lima* y *F. parvipinnis* se consideran estrechamente relacionadas (Myers, 1930; Miller, 1943; Follett, 1960 y Wiley, 1986); las cuales se originaron a partir de fundúlidos ancestrales que se dispersaron utilizando como puente corredor el Istmo de Panamá de la costa este de Norteamérica hacia las costas del Pacífico a principios del Plioceno (Bernardi y Powers, 1995). Durante esa época la península de Baja California aún se encontraba en formación, estando conformada por por tierras emergidas a manera de islas durante un proceso que concluyó con la delimitación peninsular actual a principios del cuaternario (Padilla *et al.*, 1991).

De acuerdo a estos eventos geológicos, se plantea como hipótesis en el presente estudio, que durante el Plioceno se originaron los fundúlidos peninsulares, particularmente en la parte sur de su distribución actual. Las poblaciones ancestrales de *F. lima* quedaron aisladas en cuerpos de agua costeros que por efecto del levantamiento peninsular perdieron su contacto con el mar. Dicho proceso es explicable por mecanismos de especiación alopatrica vicariante. Por otro lado, las subespecies de *F. parvipinnis* posiblemente surgieron de un proceso de diferenciación parapátrico, a partir de la dispersión de los organismos ancestrales en dirección del sur al norte en un gradiente ambiental.

Objetivo general:

Analizar la variabilidad genética poblacional del pez endémico *Fundulus lima* y de las subespecies afines de *F. parvipinnis*, de la península de Baja California, México, como una medida de su estado de conservación y proponer un esquema filogeográfico de la evolución de este complejo de especies.

Objetivos particulares

- 1) Caracterizar mediante métodos genéticos a *Fundulus lima*, una especie endémica y amenazada de la península de Baja California.

- 2) Determinar la variabilidad genética intra e interpoblacional para las especies y subespecies de fundúlidos de Baja California.
- 3) Construir un esquema de las relaciones filogenéticas entre las especies y subespecies del grupo en estudio, basado en las mediciones de la distancia genética.
- 4) Interpretar el esquema filogenético en relación con los eventos geológicos y geográficos sucedidos en el área de distribución.
- 5) Contribuir mediante la evaluación de la diversidad genética a la conservación de las especies en cuestión.

Materiales y métodos

La recolecta del material íctico se efectuó con un chinchorro (6 m x 1.5 m x 1/8") en las siguientes localidades: Boca del Arroyo Guadalupe (= La Misión, B.C.) para *Fundulus parvipinnis parvipinnis* (noviembre de 1997) (Figura 5); Bahía Magdalena (B.C.S.) para *Fundulus parvipinnis brevis* (diciembre de 1997) (Figura 6), y oasis de San Ignacio (B.C.S.) para *Fundulus lima* (diciembre de 1997) (Figura 7). Para el análisis biométrico se tomó una submuestra de 50 organismos de cada taxón, la cual se fijó en formaldehído al 10% y posteriormente se conservó en alcohol isopropílico al 50%. Adicionalmente, para el análisis de alozimas se tomó una segunda submuestra de 45 organismos por cada taxón, la cual se transportó en hielo seco al laboratorio, donde se conservó por congelación a -80 °C, hasta su posterior procesamiento.

Para el análisis biométrico se cuantificaron 18 caracteres anatómicos megamórficos (Figura 8 y Anexo 2). Las mediciones y conteos se basaron en el método estandarizado de Hubbs y Lagler (1964). Los primeros fueron efectuados con un vernier (precisión de 0.01 mm), excepto el diámetro ocular, el cual se midió con un micrómetro ocular. Los caracteres merísticos se cuantificaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Los datos biométricos se procesaron con el programa STATISTICA ver. 4.2, mediante el cual se obtuvieron las medidas de tendencia central y de dispersión, así como la correlación entre las medidas. Para identificar la separación entre grupos y los caracteres de mayor importancia en la clasificación, se utilizó el método retroescalonado del análisis de función discriminante, considerando 18 variables obtenidas a partir de los caracteres merísticos y

proporciones morfométricas. El uso de proporciones se aplicó para eliminar el sesgo por efecto de las diferencias de tallas entre los organismos.

Con base en las distancias cuadradas de Mahalanobis se construyó un dendrograma que muestra las relaciones entre los fundúlidos peninsulares.

Para el análisis alozímico, se procedió a trabajar exclusivamente con la musculatura axial, ya que se observó en la cavidad corporal e hígado de *F. lima* una alta incidencia (82.20 %) de nemátodos parásitos (*Contraecaecum multipapillatum*). Los tejidos elegidos se homogeneizaron individualmente en una solución de 0.1M Tris-HCl pH 8.0, NAD⁺, NADP⁺ y PVP (100: 0.1: 0.1: 1; v: w:w:w) (Lester, 1983), con un homogeneizador eléctrico. Las muestras homogeneizadas fueron centrifugadas a 5,500 x g por 20 min a 4 °C y los sobrenadantes transferidos a tubos con tapa y enseguida almacenados a -80 °C hasta su procesamiento electroforético, el cual se efectuó colocando intercaladamente las muestras de las diferentes poblaciones.

Para los análisis de alozimas se estandarizaron los métodos del laboratorio de electroforesis en gel de almidón (Sigma) al 10%, probándose 20 sistemas enzimáticos (Anexo 3). Basado en la nitidez y reproducibilidad de los resultados 12 sistemas fueron seleccionados, en los cuales se reconocieron 16 loci (Tabla 2). Los métodos electroforéticos empleados fueron los reportados por Grijalva-Chon *et al.* (1996) y Correa-Sandoval y Rosa-Velez (1996).

En los zimogramas se discriminó cuando entre loci génicos la variación de una zona de actividad no afectaba a otra. El fenotipo obtenido se interpretó como genotipo, de tal forma que las alelozimas se consideraron alelos y se numeraron ascendentemente en el sentido de su movilidad hacia el ánodo, con respecto al alelo más común en *F. p. parvipinnis*, al cual se designó el número 100.

Los datos obtenidos directamente de los zimogramas se analizaron con el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989) para estimar el polimorfismo, la diversidad genética (heterocigosis esperada de Nei, 1978), el equilibrio de Hardy Weinberg (mediante la prueba de Ji-cuadrada), y la distancia genética entre poblaciones (Nei, 1978). Con base en el algoritmo UPGMA se construyó un dendrograma de las distancias genéticas.

Finalmente, con el uso del programa GENEPOP ver. 1.0, se analizaron las frecuencias fenotípicas entre las tres poblaciones mediante la prueba F (Wright, 1965), en pruebas pareadas, obteniendo los respectivos valores de significancia.

Resultados.

Análisis biométrico.

De las características merísticas Graficamente examinadas (Grafica 1), el número de escamas de la serie lateral destacó como un carácter de separación entre las especies de fundúlidos peninsulares, al tener *F. lima* una mayor mediana (M= 36) que *F. parvipinnis* (M = 34).

En cada taxón, cada caracter morfométrico fue correlacionado con la longitud patrón, resultando en todos los caracteres analizados altos valores de correlación (Tabla 3), e indicando isometría con la talla (33.6 a 82.6 mm).

Para efectuar el análisis discriminante se utilizaron proporciones de las medidas morfométricas (Grafica 2), las cuales no presentaron correlaciones significativas, con lo anterior, se eliminó el efecto de redundancia de las variables y la clasificación (discriminación) dependió exclusivamente de las diferencias entre las poblaciones.

Con el análisis discriminante se obtuvo una clasificación adecuada de los organismos en tres grupos, los cuales corresponden a cada una de las poblaciones estudiadas. Los caracteres de mayor importancia ($p \leq 0.001$) para la clasificación de estos grupos fueron: radios de las aletas dorsal y caudal, escamas de la serie longitudinal, proporciones de la distancia postdorsal sobre la longitud patrón, tamaño de la boca sobre la longitud cefálica y diámetro ocular sobre la longitud cefálica (Tabla 4).

De las seis variables seleccionadas en el modelo, los valores de lambda de Wilks, resultaron similares en cinco de las variables seleccionadas, con un intervalo de 0.11 a 0.12. Las variables seleccionadas fueron: (1) radios de la dorsal, (2) radios de la caudal, (3) proporción del diámetro ocular sobre la longitud cefálica, (4) distancia postdorsal sobre la longitud patrón, y (5) tamaño de la boca sobre la longitud cefálica. El valor de lambda fue mayor en el número de escamas de la serie longitudinal (0.23), lo que implica su menor peso en el modelo de discriminación.

La magnitud de tolerancia de cada variable con respecto a las otras del modelo, como una medida de su redundancia, exhibió valores menores del 10% en las seis variables seleccionadas.

La raíz 1 obtenida del análisis discriminante, fue determinada por efecto de los radios de la aleta dorsal (RD) y el número de escamas (ES) ($Y_1 = -0.4127 \text{ RD} + 1.7348 \text{ ES}$), y la raíz 2 por las proporciones morfométricas de la distancia postdorsal con la longitud patrón (DD), tamaño de la boca (BO) y diámetro ocular (OJ) con la longitud cefálica ($Y_2 = 0.4894 \text{ DD} + 0.5589 \text{ BO} - 0.5265 \text{ OJ}$) (Tabla 5).

El modelo obtenido por el análisis de función discriminante resultó eficiente, ya que clasificó adecuadamente más del 90% de los organismos (Tabla 6 y Grafica 3).

En la matriz de distancias de Mahalanobis se observaron valores mayores entre la separación de especies y menor entre las subespecies, lo cual permitió inferir relaciones entre los grupos resultantes (Tabla 7 y Grafica 4).

Análisis alozímico.

De los 16 loci analizados, nueve fueron monomórficos en las tres poblaciones (*Mpi*, *G6pd*, *Me-1*, *Me-2*, *Ldh*, *Idh*, *Gadp*, *Pt-3* y *Aat-1*), dos fueron monomórficos intrapoblacionalmente, pero polimórficos interpoblacionalmente (*Pt-2* y *Aat-2*), uno fue monomórfico en *F. lima*, pero polimórfico en los otros fundúlidos (*Pgm*), y cuatro fueron polimórficos en las tres poblaciones (*Est-2*, *PepB*, *Mdh-1* y *Mdh-2*). En el caso particular de *PepB*, la nominación de los alelos se efectuó por interpretación de la intensidad de banda (Figura 9).

Algunos loci pueden ser considerados como diagnósticos. El alelo *Pgm*¹⁰⁰, en *F. lima*, sólo se encuentra el genotipo *Pgm*^{100/100}. El locus *Pt-2* fue monomórfico en todas las poblaciones, pero con diferentes alelos entre las especies. En las subespecies de *F. parvipinnis* sólo se presentó el genotipo *Pt-2*^{100/100}, mientras que en *F. lima* está fijado *Pt-2*^{102/102}. El locus *Aat-2* permitió diferenciar a *F. parvipinnis parvipinnis*, que tiene el alelo *Aat-2*^{100/100}, del resto de los fundúlidos peninsulares que tienen el alelo *Aat-2*^{102/102} (Tabla 8).

La especie de *F. lima* mostró menores niveles de variabilidad genética en comparación con las subespecies de *F. parvipinnis* (Tabla 9). El mismo patrón fue observado en el porcentaje de loci polimórficos (18.8 vs 25.0) como en la heterocigosis observada (0.039 vs 0.128 en *F. parvipinnis brevis* y 0.137 en *F. parvipinnis parvipinnis*).

La varianza estandarizada (F de Wright) registrada entre las poblaciones ($F_{st}= 0.60775$), implica la presencia de una estructura (Tabla 10). Pruebas pareadas entre las subespecies (*F. p. parvipinnis* vs. *F. p. brevis*), arrojaron un valor de F de Wright relativamente bajo ($F_{st}= 0.4122$) con respecto al contraste entre especies (*F. lima* vs. *F. p. brevis*, $F_{st} = 0.6168$; y *F. lima* vs. *F. p. parvipinnis* $F_{st} = 0.7311$). Estos resultados confieren evidencias de la estrecha relación entre *F. lima* y *F. p. brevis*, cuyas poblaciones son geográficamente vecinas.

Con base en la distancia genética de Nei (Tabla 11), la mayor distancia se registró entre *F. lima* y *F. p. parvipinnis* ($D= 0.247$). *F. lima* resultó menos disímil o distante de *F. p. brevis* ($D= 0.153$). La distancia entre las subespecies fue relativamente baja ($D= 0.075$), y el promedio entre especies (las subespecies de *F. parvipinnis* combinadas vs. *F. lima*) fue de 0.200. Las distancias genéticas y la relación entre grupos se ilustra en un dendrograma (Grafica 4).

Discusión:

Análisis biométrico.

Los caracteres biométricos que han sido considerados previamente en la literatura (Evermann, 1908; Miller, 1943; Miller y Lea, 1972 y Álvarez, 1970) como diagnósticos para separar a las dos especies de fundúlidos aquí en estudio, son la proporción del diámetro ocular sobre la longitud cefálica, el número de escamas en la serie longitudinal, el grado de desarrollo de las ctenas de escamas y el número de radios de las aletas dorsal y anal. Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran estadísticamente el valor diagnóstico de estos caracteres, con excepción de los ctena, y además aporta otros caracteres diagnósticos como la distancia postdorsal sobre la longitud patrón y el tamaño de la boca respecto a la longitud cefálica.

El número de escamas en la serie longitudinal y de radios de la aleta dorsal, destacan como caracteres individuales diagnósticos que permiten diferenciar a las especies y subespecies de los fundúlidos peninsulares. El valor diagnóstico de estos caracteres se sustenta en diferencias en las medidas de tendencia central, que resultan en una mayor utilidad taxonómica.

A partir del análisis de funciones discriminantes resultó un modelo que clasificó adecuadamente a las especies y subespecies de fundúlidos, lo cual brinda evidencia adicional para la separación de estos taxa.

En la discriminación se detectaron algunos individuos atípicos (Tabla 6), que fueron mal clasificados, particularmente entre las subespecies estrechamente agrupadas. La presencia de individuos atípicos entre las subespecies de *F. parvipinnis* fue reportada previamente por Myers (1930).

Todos los caracteres diagnósticos aquí referidos presentan diferencias tan sutiles que son ineficientes para la categórica identificación de las especies y subespecies a partir de la morfología externa. Las diferencias en la morfología externa van de poco sutiles entre las subespecies a relativamente marcadas entre las especies, siendo éstas coherentes con los esquemas de distancias aquí obtenidos de las relaciones entre los fundúlidos peninsulares.

Análisis alozímico.

En el análisis de alozimas destacó la presencia de alelos diferentes entre las poblaciones. Dos loci resultaron de gran valor en la identificación de fundúlidos peninsulares, *Aat-2* y *Pt-2*, los cuales a pesar de ser monomórficos intrapoblacionalmente, presentaron diferentes alelos fijados entre las especies y subespecies. Esta condición permite aquí considerarlos como marcadores bioquímicos de valor taxonómico.

En el análisis del comportamiento de la variación alélica se distinguen otras evidencias sobre la divergencia existente entre las poblaciones de fundúlidos aquí estudiados. Los loci *Pgm*, *Pep-2*, *Mdh-1* y *Mdh-2* tienen diferente comportamiento entre las poblacionales, por tanto pueden ser también considerados de valor diagnóstico, aunque limitándolos hacia el análisis genético poblacional.

La variabilidad genética promedio observada (0.128 y 0.137) en las subespecies de *F. parvipinnis*, se encuentra dentro de los intervalos conocidos (0.05 y 0.17) para otros peces (Valentine y Ayala, 1978; Ward *et al.*, 1994; Smith, 1996). En el caso de los fundúlidos, a partir de datos presentados por Grady *et al* (1990) de diferentes subpoblaciones geográficas de *F. catenatus*, se estimó una variabilidad de $H_e = 0.093$, siendo este valor muy cercano al obtenido en este estudio para *F. parvipinnis* spp.

Del pez *F. lima*, se esperaba encontrar una variabilidad genética similar a la de *F. parvipinnis* debido a su afinidad filogenética (Follett, 1960) o con un mayor valor, al tratarse de una especie dulceacuícola aislada, donde se asume una mayor diferenciación genética (Smith, 1996). En relación con lo anterior, los valores de variabilidad genética aquí obtenidos fueron bajos, lo cual puede ser atribuido, al menos, al efecto del fundador o la fragmentación y reducción del tamaño poblacional, causas que se discutirán más adelante en el marco de la evolución de este complejo de especies.

La varianza estandarizada (F_{st} de Wright) permite comparar la estructura de la población en función de un análisis de la homogeneidad de las frecuencias génicas dentro y entre muestras (Chakraborty y Leimar, 1987). En el presente trabajo, los resultados muestran baja homogeneidad entre las poblaciones y con estructuración independiente ($F_{st} = 0.6077$); lo anterior apoya el estatus taxonómico actualmente reconocido para los fundúlidos peninsulares (Miller y Hubbs, 1954).

La distancia genética ha sido aplicada en estudios sistemáticos para inferir el grado de separación entre poblaciones, subespecies y especies. En peces se registran valores de similitud genética entre 0.456 y 0.894 a nivel de especies y géneros emparentados, de 0.85 para subespecies y de 0.97 para poblaciones locales (Ayala, 1975).

La relativa cercanía geográfica entre las poblaciones de *F. lima* y aquellas de *F. p. brevis* de Bahía Magdalena (B.C.S.), permite suponer una menor distancia genética entre ellas, en comparación con las poblaciones de *F. p. parvipinnis*. Esta relación es coherente con nuestros resultados, ya que la distancia de *F. lima* con *F. p. parvipinnis* ($D = 0.247$) es mayor que la observada entre *F. lima* con *F. p. brevis* ($D = 0.153$). Asimismo, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *F. lima* derivó de *F. p. brevis*.

El promedio de la distancia genética entre especies fue de 0.200, mostrando en el dendrograma de las distancias genéticas (Grafica 4), por un lado, la estrecha relación entre las subespecies de *F. parvipinnis*, y por el otro, la separación de éstas con *F. lima*.

Con base en los resultados de la varianza estandarizada y en las distancias genéticas, se ratifica la validez taxonómica de *F. p. parvipinnis*, *F. p. brevis* y *F. lima*.

Evolución de los fundúlidos peninsulares.

A partir de la hipótesis de los centros de origen/dispersión, la biogeografía histórica pretende reconstruir las secuencias de origen y dispersión de los taxa, considerando los eventos geológicos y patrones de distribución de la biota actual (Myers y Giller, 1988). Desde este enfoque, se buscó aportar los elementos para inferir el posible origen de los fundúlidos, con base en la discusión de los resultados biométricos y del análisis de alozimas.

Es plausible suponer que el centro de origen de los fundúlidos americanos se encuentra en la vertiente Atlántica de los Estados Unidos de América (EE.UU.), donde existe la mayor diferenciación taxonómica del género (Miller, 1958, Mayden *et al.*, 1992).

Miller (1955) efectuó un análisis de las especies del género *Fundulus*, donde muestra que se distribuyen principalmente en la vertiente Atlántica de los Estados Unidos de América, con excepción de *F. zebrinus*, el que se localiza desde Texas hasta Colorado, *F. persimilis*, *F. grandissimus* y *F. balboe*, todas éstas con distribución hacia centroamérica, y *F. parvipinnis* y *F. lima*, ambos restringidos a la vertiente Pacífico de California (EE.UU.) y Baja California (México).

Con base en estudios de secuencias del gen citocromo b (Bernardi y Powers, 1995), se planteó como hipótesis que el género *Fundulus* emigró durante el Plioceno desde la costa oriental de los Estados Unidos de América hacia el oeste, utilizando como ruta la región del Istmo de Panamá.

Durante el Plioceno, la península de Baja California se encontraba aún en proceso de formación (López, 1982). La emersión de la península sobre el nivel del mar se presentó en el Plioceno a manera de formaciones insulares. El proceso concluyó durante el Cuaternario con la presencia de batolito peninsular y la Sierra La Giganta (Padilla *et al.*, 1991).

Con el marco de referencia anterior, el origen de los fundúlidos del Pacífico se sitúa en el extremo sur de la península. Con esta hipótesis, supondríamos que la dispersión se efectuó en dirección sur (Istmo de Panamá) a norte (Baja California y California) en el Plioceno.

Por tanto, el posible origen de *F. lima*, puede ser fundamentado en la evolución geológica de la península. Durante el Plioceno la península presentó una paulatina emersión sobre el nivel del mar, formándose sistemas costeros que perdieron su contacto con el mar. En estos sistemas quedaron atrapados organismos ancestrales de *F. lima*, dando inicio a un proceso de especiación alopátrico vicariante.

Por otro lado, la población ancestral de *F. parvipinnis* se dispersó a lo largo de la región biogeográfica Californiana, diferenciándose allí la subespecie *F. p. parvipinnis*. Mientras que en el sur, particularmente en el área de Bahía Magdalena, que es la zona de transición entre las provincias Californiana y Mexicana (Briggs, 1974) derivó *F. p. brevis*.

En este ámbito de distribución se presenta una gradación ambiental que favorece la formación de clinas. Un aislamiento entre las poblaciones de fundúlidos costeros de la zona sur con aquellos de la zona norte posiblemente ocurrió, ya que actualmente *F. p. brevis* tiene un ámbito de distribución confinado a Bahía Magdalena. La formación de estas dos subespecies es un ejemplo típico de diferenciación parapátrica.

Con base en esta hipótesis esperaríamos encontrar una contundente separación entre las especies de fundúlidos peninsulares, las cuales poseen una estructuración independiente y una divergencia importantes en los alelos; asimismo, a nivel de subespecies, una menor separación y una estructuración independiente.

Los resultados biométricos y alozímicos generados en el presente trabajo, muestran la separación y estructuración independiente entre los fundúlidos, además de la divergencia en algunos alelos y caracteres, siendo mayor el grado de diferencias entre especies y menor entre las subespecies.

Para evaluar la contundencia en la separación de los fundúlidos, es necesario estimar el tiempo de origen y divergencia de las poblaciones. En la biogeografía histórica se han buscado diversas evidencias para determinar el tiempo de origen de un grupo, utilizando fósiles (Briggs, 1974) o a través de relojes moleculares (Nei, 1987).

Los registros fósiles de fundúlidos son escasos y fragmentarios. Estos fósiles están representados en el oeste de la actual división continental desde el Plioceno, con al menos cinco especies: *F. nevadensis*, *F. erdisi*, *F. curryi*, *F. eulepis* y *F. davidae* (Miller, 1958). Los fósiles encontrados son de la región este de California y sur de Nevada (Miller, 1958).

En cuanto a los relojes moleculares, es posible estimar el tiempo de divergencia entre poblaciones a partir de la información genética. Con el modelo de Nei (1987) de $t = k D$, se estima el tiempo de divergencia (t) a partir de las distancias genéticas (D), considerando como constante la tasa mutacional (k). Sin embargo, este modelo tiene limitaciones relacionadas con la dificultad para satisfacer algunos supuestos básicos, como son el conocer la proporción de sustituciones de aminoácidos, la tasa promedio anual de sustituciones de aminoácidos, detectabilidad de diferencias y la demostración de la relación entre el tiempo y la distancia genética (Nei, 1988; Avise, 1994).

Considerando las limitantes del modelo, este se puede aplicar como una aproximación basada en valores generales, para calcular el tiempo de divergencia, considerando una tasa mutacional de $k = 5 \times 10^{-6}$, la que se obtiene a través de contrastar en diferentes grupos de peces, el tiempo estimado a partir de la distancia genética contra la estimación del tiempo con otras fuentes de información histórica (Nei, 1988).

Con este valor general de k , la divergencia de *F. lima* se ubica a mediados del Pleistoceno, y la divergencia entre las subespecies de *F. parvipinnis* a finales del Pleistoceno (Gráfica 5). Desde esa época, la península de Baja California ha presentado una fisiografía similar a la actual (Padilla *et al.*, 1991), por tanto, se presume que el origen de los fundúlidos peninsulares fue evolutivamente más reciente de lo que se esperaba.

Con el escenario de dispersión desde el sur (Panamá) hacia el norte (península de Baja California), es difícil interpretar la ausencia de representantes del género *Fundulus* en la vertiente Pacífico de mesoamérica, aunque la distribución del género en el Atlántico es relativamente continua desde su centro de origen en la costa este de Norteamérica hasta Panamá (Miller, 1958). Finalmente, resulta complejo explicar la posible dispersión del género *Fundulus* en el Pacífico con una dirección sur a norte, en contra de la influencia que produce la Corriente de California, la cual tiene una dirección de norte-sur.

Para explicar el proceso histórico de dispersión de un grupo, es necesario precisar evidencias adicionales con las especies relacionadas. En el caso de *F. parvipinnis*, se observa un patrón de distribución similar al de otras especies de la provincia Californiana, las cuales generalmente se dispersan a favor de la corriente de California en dirección norte a sur. Para *F. lima*, las especies ícticas coexistentes son exóticas (Ruiz-Campos y Contreras-Balderas, 1987) y en el caso de su nemátodo parásito, éste presenta una distribución amplia y es dispersado por aves ictiófagas (Valles-Ríos, 1997). Por lo anterior, las evidencias que pueden brindar las especies relacionadas son limitadas.

Otra alternativa para explicar la dispersión se obtiene de procesos análogos. Para la ictiofauna continental de la península de Baja California solo se han descrito tres taxa endémicos: *F. lima* (Evermann, 1908), *Gobiesox juniperoserrai* (Espinosa-Pérez y Castro-Aguirre, 1996) y *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann, 1908). El gobiesócido *G. juniperoserrai* tiene una gran afinidad con *G. mexicanus*, el cual se distribuye en las costas de Jalisco y Michoacán (México), y cuyo origen durante el Mioceno o Plioceno resultó de un proceso alopatrico relacionado con la deriva de la península hacia el noroeste (Espinosa-Pérez y Castro-Aguirre, 1996). Sin embargo, los fundúlidos peninsulares no presentan grupos relacionados en otras costas de México, por tanto, el proceso de dispersión no es análogo al de *G. juniperoserrai*.

Contrastantemente, la subespecie endémica *O. mykiss nelsoni*, tiene una mayor afinidad con las formas de trucha arcoiris costera distribuidas en el sur de California, originándose por un proceso vicariante a partir de organismos ancestrales, los cuales se dispersaron a lo largo de la costa en dirección norte-sur (Ruiz-Campos y Pister, 1995). Este proceso de dispersión podría ser similar al de los fundúlidos peninsulares.

La hipótesis de dispersión sur-norte es posible descartarla si consideramos la evidencia fósil, el origen de los taxa durante el Pleistoceno, la ausencia de representantes en Mesoamérica y la dispersión en contra del efecto de la Corriente de California.

Otra posible hipótesis para explicar el origen y distribución de los fundúlidos peninsulares sería ubicando su centro de dispersión durante el Pleistoceno en la parte norte de su distribución actual. En este caso, *F. p. parvipinnis* se relacionaría con el linaje más antiguo.

Las evidencias fósiles son coherentes con un posible centro de origen de los fundúlidos en la zona norte de su actual distribución, considerando los reportes de Miller (1958) para California (EE.UU.).

Si asumimos que la dispersión de la especie ancestral de *F. parvipinnis* tuvo la misma dirección que la Corriente de California, la cual tiene su límite más sureño en Bahía Magdalena, B.C.S. (Briggs, 1974), entonces la gradación ambiental permitió la formación de una clina y la consecuente derivación de la subespecie de *F. p. brevis*, mediante un proceso parapátrico (Endler, 1977).

La formación de la especie de *F. lima* podría ser relativamente reciente a partir de organismos de *F. parvipinnis* que penetraron continentalmente vía fluvial, durante las lluvias continuas características del Pleistoceno (Van Devender *et al.*, 1987), estableciéndose en los oasis actuales.

Esta hipótesis no busca explicar el paso de los fundúlidos a través del macizo continental, ya que la dispersión del género del Atlántico hacia el Pacífico, llegó únicamente a Wyoming (*F. sciadiscus*), Colorado y Nuevo México (*F. zebrinus*) (Miller, 1955), pero es plausible suponer que los representantes ancestrales de este género pudieron llegar a la vertiente del Pacífico vía corrientes fluviales.

En este escenario, la baja variabilidad genética encontrada en *F. lima* podría estar relacionada al menos con un efecto del fundador (Tamarin, 1996), fragmentación de la población y reducción en el tamaño poblacional (Gall, 1988).

El efecto del fundador se pudo haber producido cuando individuos ancestrales de *F. parvipinnis*, los cuales no representaban la variabilidad genética de las poblaciones costeras, penetraron a los sistemas continentales y, a partir de éstos, se originó *F. lima*. Un argumento a favor de la anterior posibilidad es que *F. parvipinnis* tiene la capacidad de penetrar en las aguas continentales (Follett, 1960) e incluso reproducirse (Miller, 1943).

La especie *F. lima*, es aquí considerada vicaria (Miller, 1958) y al igual que muchos otros peces vicarios de reciente diferenciación a partir de ancestros marinos, atribuyédoseles la capacidad de cruzar pequeñas barreras de salinidad (Myers, 1951). Además, el cambio climático en la península de Baja California de lluvioso a seco, fue gradual (Van Devender

et al., 1987). Con base en lo anterior, es plausible asumir que durante su origen *F. lima* tuvo la capacidad de dispersarse entre cuencas hidrológicas conectadas, y que posteriormente éstas se aislaron para dar lugar a los oasis actuales. La interconexión hidrológica durante ese tiempo permitió el flujo genético interpoblacional.

La fragmentación y reducción del tamaño de la población puede ser otra explicación de la baja variabilidad. Si suponemos una población ancestral de *F. lima* fragmentándose paulatinamente en subpoblaciones en los diferentes oasis, las cuales no fueron genéticamente representativas de la población original, se esperaría una reducción en la variabilidad genética. A favor de este supuesto, la distribución actual de *F. lima* en las distintas cuencas hidrológicas (oasis) se encuentra fragmentada (Ruiz-Campos y Contreras-Balderas, 1987; Reynoso-Mendoza, 1994; Ruiz-Campos *et al.*, 1998a).

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se brindan argumentos significativos a favor de la separación taxonómica de las especies y subespecies de fundúlidos peninsulares. Probablemente su dispersión a lo largo de las costas de Pacífico se inició a partir de un centro de origen en el estado de California (EE.UU.), durante el Pleistoceno.

La dispersión de *F. parvipinnis*, en dirección norte-sur, dentro de un gradiente ambiental, provocó un proceso parcial de especiación parapátrica con subsecuente aislamiento genético, originando así las actuales subespecies *F. p. parvipinnis* y *F. p. brevis*.

La especie de *F. lima* se originó a partir de la migración de algunos organismos de *F. parvipinnis* vía fluvial hasta los actuales oasis, resultando de una especiación alopátrica vicariante. La menor variabilidad genética que presenta *F. lima*, se relaciona principalmente a la fragmentación y reducción de sus poblaciones con su concomitante deriva génica.

Propuesta de manejo.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que el estado de conservación de las especies de fundúlidos peninsulares es diferente, ya que en *F. parvipinnis* se presenta una variabilidad genética dentro de los intervalos esperados, mientras que contrastantemente, *F. lima*, ésta es baja.

La especie *F. parvipinnis* ha sido tradicionalmente utilizada como carnada viva, aunque no existe una explotación comercial al respecto. Con base en los recorridos efectuados y pláticas con pescadores, podemos considerar tres factores determinantes para su nula explotación : (1) escasa pesca en la región que demande carnada viva, (2) uso de otras especies como carnada, y (3) desconocimiento del recurso.

El estado de conservación de *F. parvipinnis* es considerado como estable (Ruiz-Campos *et al.*, 1998b). Para su manejo como carnada viva presenta diversas ventajas, tales como alta tolerancia a las variaciones ambientales como temperatura y salinidad, lo que permite un relativo fácil transporte y mantenimiento temporal. Por lo anterior, se recomienda efectuar de estudios tendientes a la explotación racional del recurso, donde se establezcan tasas y épocas de captura.

Contrastantemente, *F. lima* presenta baja variabilidad genética, la cual aunada a la disminución de sus poblaciones naturales por efecto de la reducción del hábitat, introducción de peces exóticos y otros impactos antropogénicos, se ha sugerido considerarla en riesgo moderado de extinción (Ruiz-Campos *et al.*, 1998a).

Conservación de *F. lima*

El hallazgo de baja variabilidad genética en una población puede ser el resultado de diversos factores, tales como: efecto de fundador, selección en contra de heterocigotos, cuellos de botella, metodología de trabajo (Tamarin, 1996), fragmentación, y reducción de las poblaciones (Gall, 1988).

En el presente trabajo, la baja variabilidad genética registrada en *F. lima*, , se considera que está principalmente relacionada con un efecto de la fragmentación y reducción de las poblaciones, aunque no es posible descartar el efecto de uno o varios de los otros factores relacionados al hallazgo de la baja variabilidad genética.

La baja variabilidad genética tiene un efecto en la probabilidad que determina la persistencia de la especie (Caughley y Gumm, 1996), incrementándose la susceptibilidad a diversos efectos genéticos, como la endogamia, pérdida de flexibilidad evolutiva y depresión por hibridación (Primack, 1993). Las consecuencias de la baja variabilidad genética se incrementan en poblaciones reducidas, al aumentar la probabilidad de variación de las frecuencias génicas en una o pocas generaciones e incrementarse el efecto de la deriva génica. Un tamaño poblacional reducido con baja variabilidad genética está asociado a fluctuaciones demográficas, declinaciones súbitas en números y extinciones locales (Primack, 1993).

Para determinar la evolución de los riesgos que tiene una población con estas características, se recomienda el monitoreo en el tiempo de la variabilidad genética (Caughley y Gumm, 1996), lo que adicionalmente brindaría una mayor información sobre los factores causales y consecuencias de la baja variabilidad.

Por lo anterior, y con fundamento en los resultados obtenidos en el presente trabajo, respecto a la baja variabilidad genética de *F. lima*, se propone una recategorización del estado de conservación de *F. lima*, de especie amenazada a especie con riesgo moderado de extinción, siendo ésta última coherente con la evaluación recientemente realizada por Ruiz-Campos *et al.* (1998a).

Se han sugerido diversos tratamientos para recuperar especies en vías de extinción, como pueden ser la protección del hábitat y la conservación *ex situ* (Caughley y Gumm, 1996).

Protección del hábitat.

El Oasis de San Ignacio, localidad tipo de *F. lima*, se encuentra ubicado en la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno, decretada el 30 de noviembre de 1988 (Breceda *et al.*, 1991).

Las zonas de amortiguamiento están destinadas como zonas de protección del impacto exterior a la zona núcleo de la Reserva de la Biosfera. En dichas zonas se autoriza la realización de actividades productivas que permitan la conservación de los ecosistemas (SEDUE, 1988).

Las principales actividades productivas que se realizan en la región son la agricultura y la pesca. La agricultura se realiza principalmente en el Valle del Vizcaíno, con restricciones asociadas a la escasez del recurso hidrológico. La actividad pesquera está dirigida a los recursos marinos de las zonas costeras aledañas. Adicionalmente, el sector secundario está restringido por la situación geográfica aislada de la localidad y está enfocado a la transformación de algunas materias primas producidas en la región. El sector terciario está enfocado al abasto de productos y servicios básicos, con un turismo marginal (Castellanos y Mendoza, 1991).

La protección del hábitat de *F. lima* es congruente con la legislación (SEDUE, 1988) y podemos considerar que no modifica las actividades productivas de la región, por lo que se sugiere incluir al Oasis de San Ignacio dentro de las zonas de protección especial de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno, considerándola como un área de resguardo y conservación de germoplasma endémico.

El principal impacto antropogénico observado en el Oasis de San Ignacio, ha sido la introducción de peces exóticos, como *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus helleri* y *Cyprinus carpio*. De las especies exóticas introducidas sobresale *X. helleri*, ya que presenta un alto traslape trófico con *F. lima* (Alaniz-García, 1995).

La introducción de peces exóticos en otros oasis de Baja California Sur, particularmente de tilapia (*Tilapia* spp.), se ha asociado con la disminución numérica de las poblaciones de *F. lima* (Ruiz-Campos, *et al.*, 1998a).

Para amortiguar el impacto provocado por las especies introducidas, pueden brindar adecuados resultados el establecimiento de programas dirigidos a la extracción selectiva de las especies exóticas.

Conservación *ex situ*.

La realización de cultivos *ex situ* como estrategia de conservación de los recursos naturales ha sido aplicada en diversas especies (Caughley y Gumm, 1996). Esta estrategia de conservación debe estar diseñada para mantener la heterocigosis e identidad de las subpoblaciones evolutivamente divergentes (Nielsen *et al.*, 1997).

De forma colateral a la realización del presente trabajo, diez ejemplares de *F. lima* se transportaron vivos al Bioterio de la Facultad de Ciencias(UABC), donde se mantuvieron en acuarios en condiciones estándar por un periodo de seis meses. En dicho periodo se observó una alta mortalidad (80%) asociada a la aclimatación al cultivo y al parasitismo del nemátodo *Contracacum multipapillatum*, presente en la totalidad de los organismos. Este nemátodo utiliza a *F. lima* como huésped intermedio, siendo las aves ictiófagas los huéspedes definitivos. Este parásito ocupa como huésped intermediario a una amplia gama de especies ícticas, pudiendo provocar la muerte de los organismos juveniles (Valles-Rios, 1997).

El parasitismo observado en *F. lima* en condiciones de cautiverio, nos permite sugerir que para su mantenimiento *ex situ*, los organismos deberán estar exentos de parásitos para ser seleccionados.

Las estrategias de conservación *ex situ* aplicables a la ictiofauna dulceacuícola, incluyen la conservación en medios de diferente nivel de complejidad, desde acuarios, espacios en zoológicos, el uso de otros sistemas acuáticos disponibles y el acondicionamiento de nuevos hábitats.

En cuanto al manejo en acuarios, *F. lima* (denominada comúnmente "Baja killifish" o sardinilla de la península) ha despertado el interés en grupos de acuaristas como el "San Diego Killifish Group", que ha efectuado expediciones a la península de Baja California para recolectar organismos (Stowell, 1980). Con algunos de estos organismos se logró la reproducción en condiciones de acuario y se describió su conducta reproductiva (Brill, 1982).

Los cultivos en acuarios particulares (como los de Stowell, 1980, y Brill, 1982), son una alternativa para conservación de *F. lima*. Los grupos organizados de acuaristas en diferentes países promueven la conservación de especies en peligro a través de su estudio, por ejemplo, la Asociación Norteamericana de Peces Nativos ("North American Native Fishes Association"). En México son prácticamente inexistentes este tipo de asociaciones.

Desde un punto de vista popular, este tipo de asociaciones promueve la conservación de los organismos en cautiverio, aunque comúnmente con la desventaja de centrar la atención en

el valor ornamental y consecuentemente ignorada la variabilidad genética o la propia recuperación de las poblaciones naturales.

El manejo por particulares de una especie en peligro, conlleva otros riesgos derivados de la comercialización y tráfico ilegal de especies, lo que exige establecer adecuadas políticas gubernamentales.

Por tal motivo, el establecimiento de sistemas de cultivo dependientes de las instituciones públicas, pueden brindar un adecuado control en el manejo de las especies en peligro de extinción, particularmente en las universidades en donde existen profesionistas en materia ambiental que actualmente coordinan programas en conservación y recuperación de poblaciones naturales.

Por lo antes expuesto, se sugiere realizar una selección de organismos de *F. lima* del Oasis de San Ignacio, para que sean destinados a sistemas de cultivo que tienen como objetivo la conservación de recursos.

La identificación de oasis en los que hay poco impacto antropogénico, por introducción de exóticos, y en los que adicionalmente sea permisible establecer políticas de protección y programas de manejo, representaría un siguiente paso en la búsqueda de estrategias de conservación *ex situ*.

Difusión.

El establecimiento de programas de protección de especies que están desvinculados con los sectores sociales y productivos, pueden tener baja repercusión desde este contexto, por lo que es recomendable establecer programas de difusión de forma colateral.

Esta especie endémica de la península de Baja California es poco conocida por los habitantes de la región, inclusive en el mismo poblado de San Ignacio, aledaño al oasis, por lo cual se recomienda el inicio de programas de difusión acerca de este recurso.

Conservar a *F. lima*, involucra mantener a una de las dos únicas especies ícticas endémicas de la península de Baja California, que se encuentra en una de las Reservas de la Biosfera (Reserva de la Biosfera del Vizcaíno), dentro de una estrategia nacional para preservar la Biodiversidad de México.

Síntesis.

En conclusión se recomienda: (1) Recategorizar el estado de conservación de *F. lima*, de amenazada por el de riesgo moderado de extinción; (2) Incluir al Oasis de San Ignacio dentro de las zonas de protección especial de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno, como un área de resguardo y conservación de germoplasma endémico; (3) Prohibir la introducción de especies exóticas en la cuenca hidrológica de San Ignacio y en otras adyacentes; (4) Realizar una selección de organismos de *F. lima* para destinarlos a sistemas de cultivo *ex situ* en apoyo a los programas de conservación de este recurso; y (5) Efectuar trabajos de difusión acerca de esta especie, dirigidos a los habitantes de la región.

Literatura citada

- Abreu-Grobois, F.A. (1983). Population genetics of *Artemia*. Ph.D. Thesis Univ. Coll. Swansea.
- Alaniz-García, J. (1995). Interacción trófica entre dos especies icticas, *Fundulus lima* Vaillant y *Xiphophorus helleri* Heckel, en el oasis de San Ignacio, Baja California Sur, México, Tesis de Maestría en Ciencias, UABC., México; pp: 1-81.
- Álvarez V., J. (1970). Peces Mexicanos (claves). Inst. Nal. Inv. Pesq. México.
- Avise, J.C. (1994). Molecular markers natural history and evolution. Ed. Chapman Hall.
- Avise; J.C. (1974). Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23:465-481.
- Ayala, F.J. (1975). Genetic differentiation during the speciation process. En: Evolutionary Biology, (Vol.8), Editores Hecht, M.K. y W.C. Steere. Plenum Press, p: 1-78.
- Bernardi; G. y D.A. Powers. (1995). Phylogenetic relationships among nine species from the genus *Fundulus* (cyprinodontiformes, Fundulidae) inferred from sequences of the cytochrome B gene. Copeia 2:469-473.
- Breceda, A.; A. Castellanos; L. Arriaga y A. Ortega. (1991). Conservación y áreas protegidas. En Ortega, A. y L. Arriaga (eds.) La Reserva de la Biosfera El Vizcaíno en la Península de Baja California. CIB-BCS, A.C. Pub.4: 21-32.
- Briggs, J.C. (1974). Marine zoogeography. McGraw-Hill Co., New York.
- Brill; J.S. (1982). Observations on the unique reproductive behavior of *Fundulus lima* Vaillant, a killifish from Baja, California. Aquarium 10-90.
- Brown , B.L. y R.W. Chapman (1991). Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Evolution 45(5):1147-1161.
- Cabrera-Santillan, S. (1997). Aspectos ecológicos de la Ictiofauna de la Bocana del Arroyo la Misión, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias, UABC., México; pp: 1-59.
- Cashner, R.C., J.S. Rogers y J.M. Grady. (1992). Phylogenetic studies of the genus *Fundulus*. En: Systematics, Historical ecology, and North America freshwater fishes, Editor Mayden, R.L. USA: Stanford University Press, p: 421-437.
- Castellanos V., A. y R. Mendoza S. (1991). Aspectos socioeconómicos. En Ortega, A. y L. Arriaga (eds.) La Reserva de la Biosfera El Vizcaíno en la Península de Baja California. CIB-BCS, A.C. Pub.4: -33-52.
- Caughley, G. y A.Gumm (1996). Conservation biology in theory and practice. Ed. Blackwell Science, USA: 163-191.
- Chakraborty, R. y O. Leimar. (1988). Genetic variation within a subdivided population. En: Population, genetics and fishery management, Editores Ryman, N. y F. Utter. USA: p: 89-120.
- Chapman; R.W. y D.A. Powers. (1984). A method for the rapid isolation of mitochondrial DNA from fishes. Technical report. Maryland Sea Grant Program. 1-11.
- Clayton; J.W. y D.N. Tretiak. (1972). Amine-Citrate Buffers for pH Control in Starch Gel Electrophoresis. J.Fish.Res.B.Can. 29(8):1169-1172.
- Correa-Sandoval, F. y J. de la Rosa-Velez. (1996). Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) from Mexico. Procc. of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture: 165-171.
- De La Cruz-Agüero; J., M. Arellano-Martínez y V.M Cota-Gómez. (1996). Systematic List of the marine fishes from Ojo de Liebre and Guerrero Negro lagoons, BCS and BC, México. Ciencias Marinas 22:111-128.
- Delgadillo-Rodríguez, J. (1992). Florística y ecología del Norte de Baja California. Ed. UABC.

- Dickinson, W.R. (1977). Paleozoic Plate Tectonics and Evolutions of the Cordilleran Continental Margin. En Stevens J.H. y A.E. Fritsche (eds.) Paleozoic Paleogeography of the Western United States. Pac. Sec. Econom. Paleontol. Mineral. Pac. Coast Paleogogr. Symp. 1: 137-156.
- DiMichele; L., D.A. Powers y J.A. DiMichele. (1986). Developmental and physiological consequences of genetic variation at enzyme synthesizing loci in *Fundulus heteroclitus*. Amer.Zool. 26:201-208,
- Espinosa-Perez, H. y J.L. Castro-Aguirre (1996). A new freshwater clingfish (Pisces: Gobiessocidae) from Baja California Sur, México. Bull. Southern. California Acad. Sci. 95 (6):120-126.
- Evermann; B.W. (1908). Descriptions of a new species of trout (*Salmo nelsoni*) and a new cyprinodont (*Fundulus meeki*) with notes on other fishes from lower California. Proc. Biol. Soc. Washington 21:19-30.
- Follett, W.I. (1960). The fresh water fishes origins and Affinities. Syst. Zool. 9:212-232.
- Fritz, E.S. (1975). The history of the California Killifish *Fundulus parvipinnis* Girard, in Anaheim Bay, California. California Dept. Fish and game, Fish Bull. 165: 91-106.
- Gall, G.A. (1988). Inbreeding. En: Population, genetics and fisheries management, Editores Ryman, N. y F. Utter. USA: p: 47-87.
- Grady; J.M., R.C. Cashner y J.S. Rogers. (1990). Evolutionary and biogeographic relationships of *Fundulus catenatus* (Fundulidae). Copeia 2:315-323,.
- Grant, W.S.; G.B. Milner; P. Krasnowski y F.M. Utter (1980). Use of biochemical genetic variants for identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in Cook Inlet, Alaska. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37: 1236-1247.
- Grijalva-Chon; J.M., J.de la Rosa-Vélez. y Oscar Sosa N. (1996). Allozyme variability in two samples of swordfish, *Xiphias gladius* L., in the North Pacific Ocean. Fish.Bull. 94(3):589-594.
- Grismer; L.L. y J.A. McGuire. (1993). The oases of central Baja California, Mexico. Part I. A preliminary account of the relict mesophilic herpetofauna and status of the oases. Bull.Southern California Acad. Sci. 92 (1):2-24.
- Hillis, D.M.; C. Moritz y B.K. Mable (1996). Molecular Systematics. Seg. ed. U.S.A. Ed.Sinauer.
- Hoezel, A.R. (ed). (1992). Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, England.
- Hubbs, C.L. y K.F.Lagler (1964). Fishes of the Great Lakes Region. The University of Michigan Press.
- Jordan, D.S. y B.W. Evermann. (1896). The fishes of North and Middle America. Bull. U.S. Nat. Mus. 47.
- Lagler, K.F. ; J.E. Bardach; R.R. Miller y D.R. MayPassino.(1990). Ictiología. Ed. AGT E. S.A. pag. 430-432.
- Lester, L.J. (1983). Developing a selective breeding program for penaeid shrimp mariculture. Aquaculture 33:41-50.
- López R., E. (1982). Geología de México, Tomo II. 3er. ed. México.
- Mayden R.L.; B.M. Burr; L.M.Page y R.R. Miller (1992). The native freshwater fishes of North America. En: Mayden, R.L. (ed.) Systematics, Historical ecology, and North America freshwater fishes, USA: Stanford University Press, p: 827-863.
- McGinnis, S.M. (1984). Freshwater fishes of California. Cal. Nat. Hist. Guides 49.
- Miller; R.R. (1939). Occurrence of the cyprinodont fish *Fundulus parvipinnis* in fresh water in San Juan Creek, southern California. Copeia 168.
- Miller; R.R. (1943). Further data on Fresh water populations of the Pacific Killifish *Fundulus parvipinnis*. Copeia 51-52.

- Miller; R.R. (1955). An annotated list of the american cyprinodontid fishes of the genus *Fundulus*, with the description of *Fundulus persimilis* from Yucatan. Occasional Papers of the Museum of Zoology, Univ.Michigan 568:1-26.
- Miller; R.R. (1958). Origins and affinities of the freshwater fish fauna of Western North America, In Hubbs, C.L. Zoogeography. Amer.Assoc. Adv.Sci. 51:187-222.
- Miller; R.R. y C.L. Hubbs. (1954). An erroneous record of the California Killifish, *Fundulus parvipinnis*, from Cabo San Lucas, Baja California. Copeia 234-235.
- Miller R.R. y R.N. Lea (1972). Guide to the coastal marine fishes of California. California Dept. Fish & Game. Fish. Bull. 157.
- Mitton, J.B. (1993). Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental stability. Genetica 89: 47-65.
- Moyle, P.B.(1976). Inland fishes of California. University of California Press. Berkeley
- Myers, A. A. y P.S. Giller (1988). Analytical Biogeography. Ed. Chapman-Hall.
- Myers; G.S. (1927). On the identity of the Killifish *Fundulus meeki* Evermann with *Fundulus lima* Vaillant. Copeia
- Myers; G.S. (1930).The Killifish of San Ignacio and stickleback of San Ramon, Lower California. Proc. Cal. Acad. Sci. 4 (19):95-104.
- Myers, G.S. (1951). Fresh water fishes and east Indian. Zoogeography Stanford Ichty Bull 4(1):11 -21.
- Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia Univ. Press. New York.
- Nei; M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Gen. 89:553-590.
- Nei, M. (1988). Genetic distance and molecular phylogeny. En: Population, genetics and fisheries management, Editores Ryman, N. y F. Utter. USA: p: 193-223.
- Nielsen, J.L.; C. Carpanzano; M.C. Fountain y Ch. A. Gan (1997). Mitochondrial and nuclear microsatellite diversity in hatchery and wild *Oncorhynchus mykiss* from freshwater habitats in southern California. Trans. Am. Fish. Soc. 126: 397-417.
- Osburn, R.C. y J.T.Nichols (1916). Shore fishes collected by the Albatros expedition in Lower California with descriptions of new species. Bull. Amer. Mus. Natur. Hist. 35: 139-181.
- Padilla, G., S. Pedrin y E. Troyo D. (1991). Geología. En: La reserva de la biosfera el Vizcaíno en la península de Baja California, Editores Ortega, A. y L. Arriaga. Mexico: CIB, p: 72-93.
- Parenti; L.R. (1981). A Phylogenetic and biogeographic analysis of ciprinodontiform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). Bull.Amer.Mus.Nat.Hist. 168:341-557,
- Park, K.P. y P. Moran (1994). Developments in molecular genetic, techniques in fisheries. Rev. Fish. Biol. Fish. 4(3): 272-299.
- Powers; D.A., T. Lauerman, D. Crawford, M. Smith, I. Gonzalez V. y L. DiMichele. (1991). The evolutionary significance of genetic variation at enzyme synthesizing loci in the teleost *Fundulus heteroclitus*. J.Fish.Biol. 39 (supplement A):169-184.
- Primack, R.B. (1993). Essentials of conservation biology. Ed. Sinauer. USA.
- Reynoso-Mendoza M., F. (1994). A new population of *Fundulus lima* Vaillant 1894 (Cyprinodontidae) in Baja California península, México. Twenty sixth Ann. Simp. Des. Fish. Coun. Death Valley Ca.
- Rosa-Vélez, J. de la (1986). Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis Doctoral. UNAM.
- Ruiz-Campos, G. y S. Contreras-Balderas B.. (1987). Ecological and zoogeographical check list of the continental fishes of the Baja California Península, Mexico. Proc.Des.Fish.Council 17:105-117,

- Ruiz- Campos, G. y E.P. Pister (1995). Distribution, habitat, and current status of the San Pedro Mártir rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann). Bull. Southern California Acad. Sci. 94(2): 131-148.
- Ruiz-Campos, G. y J. Alaniz-García G.. (1995). Limnological characterization of the San Ignacio Oasis, Baja California Sur, Mexico, as a habitat of the endemic killifish, *Fundulus lima* (Vaillant). Proc.Des.Fish.Council 25.
- Ruiz-Campos, G.; J.L. Castro A.; A.F. González A. y S. Sánchez G. (1998a). Estatus de conservación de *Fundulus lima* Vaillant 1894 (Pisces: Fundulidae) de la Península de Baja California, México. Mem. VI. Cong. Nal. Ict. Tuxpam Ver. México.
- Ruiz-Campos, G.; S. Contreras-Balderas; M.L. Lozano-Vilano; S. González-Guzman y J.Alaniz-García (1998b). Estatus ecológico distribucional de los peces continentales del noroeste de Baja California, México: Distrito San Dieguense. Informe Técnico Proyecto 431100-5-1993PN, CONACYT.
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch y T. Maniatis. (1989). Molecular cloning. 2da. ed. U.S.A. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Schaal, B.A. y W.W. Anderson (1974). An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Tech.Rep. Georgia Mar. Sci. Cent. 74 (3): 1-18.
- SEDUE (1988). Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.Diario oficial 28-1-88.
- SEDUE (1994). Norma oficial mexicana NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas, en peligro de extinción, amenazadas raras y sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial 16 de Mayo (Prim.sec):51.
- Selander; R.K., M.H. Smith, S.Y. Yang, W.E. Johnson y J.B. Gentry. (1971). Biochemical Polymorphism and Systematics in the Genus *Peromyscus*. I. Variation in the Old-field Mouse. Studies in Genetics 49-90.
- Shaw, C.R. y R. Prasad (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.
- Smith, P.J. (1996). La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos: Posibles repercusiones de la pesca. FAO Doc. Tec. Pes. 334. Roma, 59 p.
- Squires; R.L. y R.A. Demetron. (1992). Paleontology of the Eocene Bateque Formation, Baja California Sur, Mexico. Nat.Hist.Mus.L.A.,Cont.Sc. 434:1-55.
- Stowell, Ch. H. (1980). In sarch of *Fundulus lima*. Freshwater and Marine Aquarium: 11-18, 86, 88-89
- Swofford; D.L. y R.B. Selander. (1981). Biosys-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. J.Hered. 72:281-283.
- Tamarin, R.H. (1996). Principios de Genética. Ed. Reverte, México.
- Valentine, J.W. y F.J.Ayala (1978). Adaptative strategies in the sea. En: Battaglia, B. y J. A. Beardmore, eds. Marine organisms, genetics, ecology and evolution. Plenum Press.
- Valles-Ríos R, M.E. (1997). Estudio comparativo y cuantitativo de macroparásitos en peces de la región del Río Colorado- Hardy, Baja California, México. Tesis Maestría, Fac. Ciencias, UABC.
- Vaillant, L. (1894). Sur une collection de poissons recueillie en Base-Californie et dans de Golfe par M. Leon Diguët. Bull. Soc. Philomanque de Paris. Series 3 (6):69-75.
- Van Devender, T.R., R.S. Thompson y J.L. Betancourt. (1987). Vegetation history of the deserts of southwestern North America; The nature and timing of the Late Wisconsin-Holocene transition. En: North America and adjacent oceans during the last deglatiation, Editores Ruddiman, W.F. y H.E.Jr. Wright. USA: The Geological Society, p: 323-352.

- Van Devender, T.R.; R.S. Thompson y J.L. Betancourt (1987). Vegetation history of the deserts of Southwestern North America; The nature and timing of the late Wisconsin- Holocene transition. En: North America and adjacent oceans during the last deglaciation. Eds. Ruddiman, W.F. y H.E. jr. Wright. USA, The Geological Society :323-352.
- Ward, R.D.; N.G. Elliot; P.M. Grewe y A. J. Smolensky. (1994). Allozyme and mitochondrial DNA variation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the Pacific Ocean. Mar. Biol. 118: 531-539.
- White, P.S. y L.I. D. Densmore III, (1992). Mitochondrial DNA isolation. En: Molecular genetic analysis of populations. Hoelzel, A.R. (ed). IRL Press. EE.UU.. 29-58.
- Wiley, E.O. (1986). A study of the evolutionary relationships of Fundulus Topminnows (Teleostei: Fundulidae). Amer.Zool. 26:121-130,
- Wright; S. (1977). Evolutionary genetics: Wright's treatise continued. Science 196:1191-1192.
- Wright, S (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. Evolution 19: 395-420.

ANEXO 1

Clasificación:

La clasificación de las especies del Pacífico es la siguiente:

Familia: Fundulidae

Subfamilia: Fundulinae.

Género: *Fundulus*

Subgénero: *Xenisma*.

Especies: *F. lima* Vaillant, 1894

F. parvipinnis Girard, 1854

Subespecies

F. parvipinnis parvipinnis Girard, 1854

F. parvipinnis brevis Osburn y Nichols, 1916

Diagnosis del género *Fundulus*:

Los organismos del género *Fundulus* se caracterizan por presentar el cuerpo elongado, poco elevado y comprimido posteriormente. Preopérculo, preorbital y mandíbula con poros mucosos. Aleta dorsal y anal similares en tamaño y forma. Aletas ventrales bien desarrolladas (Jordan y Evermann, 1896). Aletas pélvicas en posición abdominal, su origen por detrás de las pectorales. Una sola aleta dorsal. Sin poros en la línea lateral (Alvarez, 1970). Boca de tamaño moderado. Mandíbula inferior fuerte y usualmente se proyecta más allá del borde superior. La mandíbula con 2 o más series de dientes puntiagudos, usualmente formando una banda estrecha. Huesos de la mandíbula firmemente unidos. Huesos faríngeos no elongados. Opérculo branquial no restringido en la parte superior. Primer faríngeal superior sin dientes, segundo con dientes, tercero y cuarto co-osificado, con dientes. Puede haber diferencias entre los sexos en color, tamaño y desarrollo de las aletas. Ovíparos. Son nadadores de superficie y omnívoros,

alimentándose de invertebrados, algas (Moyle, 1976) e insectos flotantes (Jordan y Evermann, 1896).

Diagnosis de *Fundulus parvipinnis*:

La aleta dorsal se inserta antes de la inserción del primer radio anal. Seis radios branquístegos. Escamas en la serie lateral de 31 a 38. Radios en la anal de 10 a 12 (Jordan y Evermann, 1896). Aleta dorsal con 11 a 12 radios (Jordan y Evermann, 1896) o 12 a 15 radios y la anal con 11 a 16 (Miller y Lea, 1972). Diámetro ocular cuando menos 4.2 veces la longitud cefálica. Con 31 a 37 escamas en la línea lateral y de 34 a 37 vértebras. Aleta dorsal y anal redondeadas (Miller y Lea, 1972). Coloración verdosa. El macho con 20 barras cortas negruzcas que cruzan el cuerpo. La hembra con una sombra lateral oscura. Aletas más grandes en el macho que en la hembra.

Es fuertemente eurihalino y puede vivir todo su ciclo de vida en ese medio o en agua dulce (Moyle, 1976; McGinnis, 1984). En machos localizados en cuerpos de agua dulce se ha observado durante el período reproductivo la presencia de una espina central (ctena) en las escamas laterales de la base del pedúnculo caudal (Miller, 1943) y acrescencias en las aletas dorsal y anal (Ruiz-Campos *et al.*, 1998b).

Las subespecies se diferencian por el número de escamas en la línea lateral, el número de vértebras y sus ámbitos de distribución. *F. p. parvipinnis* presenta de 33 a 37 escamas en la línea lateral y de 35 a 37 vértebras, mientras que *F. p. brevis* tiene de 31 a 34 escamas en la línea lateral y 32 a 34 vértebras (Miller y Hubbs, 1954). La división en subespecies fue verificada posteriormente por Myers (1930), aunque reportó que algunos individuos de *F. p. brevis* no fueron diferenciados de *F. p. parvipinnis*.

Diagnosis de *Fundulus lima*

La longitud y el ancho de la cabeza cabe 3.1 y 3.4 en la longitud patrón; ojos 4.5 en cabeza; hocico 4; interorbital 2.7; aleta dorsal con 12 radios, anal 12 radios y escamas en la línea lateral 34. El cuerpo es corto y ancho; cabeza grande, plana, el interorbital ancho; ojos pequeños; hocico más bien grande y puntiagudo; dientes en bandas estrechas en cada mandíbula, la serie exterior mayor, subigual, con punta, firmes; pedúnculo caudal 1.4 en la cabeza; escamas bastantes grandes. Aletas pequeñas, originándose la anal bajo la mitad de

la dorsal. En los machos las escamas son sumamente rugosas, particularmente a lo largo y en el pedúnculo caudal (Evermann, 1908).

Presentan un extraordinario desarrollo de los ctena de las escamas de los machos en época de reproducción, las escamas del cuerpo son libres, con una a cuatro pequeñas espinas (Myers, 1930).

ANEXO 2

Criterios para la medición de los caracteres merísticos y morfométricos.

Las medidas somáticas y conteos merísticos (Figura 2a) fueron basados en aquellos de Hubbs y Lagler (1964), que se definen a continuación:

Longitud total. Máxima distancia entre el frente de la boca hasta el final de la aleta caudal, medido en el organismo depositado en una superficie plana.

Longitud patrón. Distancia de la parte más anterior del hocico hasta la base del abanico hipural, el cual se reconoce como un doblez al flexionar la aleta caudal.

Longitud cefálica. Distancia entre la parte más anterior del hocico y el margen óseo opércular en su porción media.

Longitud de la boca. Longitud del premaxilar en reposo.

Longitud preorbital. Distancia desde la parte más anterior del hocico hasta el margen anterior del ojo.

Diámetro ocular. Distancia horizontal entre el margen visible anterior y posterior del ojo.

Longitud postocular. Distancia desde el margen posterior del ojo hasta el margen óseo de la porción media opércular.

Longitud predorsal. Distancia desde la parte más anterior del hocico hasta el origen del primer radio de la aleta dorsal.

Ancho de la dorsal. Distancia de la base de la aleta dorsal.

Longitud postdorsal. Distancia desde el término de la aleta dorsal (base del último radio) hasta el centro del pedúnculo caudal, al término de la hipural.

Longitud postanal (longitud del pedúnculo caudal). Distancia desde el término de la aleta anal (último radio) hasta el centro del pedúnculo caudal al término de la hipural.

Altura máxima. Altura máxima del cuerpo. Distancia máxima entre los perfiles dorsal y ventral del cuerpo, sin incluir aletas.

Radios dorsal. Número de radios presentes en la aleta dorsal.

Radios de la anal. Número de radios desarrollados presentes en la aleta anal, caracterizados por presentar al menos una bifurcación.

R1. Número de pseudoradios (carecen de ramificaciones) desarrollados en la porción dorsal de la aleta, que sobresalen de una línea perpendicular del origen central de la aleta anal.

R2. Número de pseudoradios (carecen de ramificaciones) desarrollados en la porción ventral de la aleta, que sobresalen de una línea perpendicular del origen central de la aleta anal.

Radios de la anal. Número de radios presentes en la aleta anal.

Escamas. Número de escamas en la serie lateral, contadas desde la primer escama libre del opérculo hasta la base del pedúnculo caudal, la cual se reconoce como la última escama que se levanta al doblar la aleta caudal.

ANEXO 3.

Preparación del Gel de almidón.

Para la preparación del gel de almidón, se pesan 65 gr. de almidón (Sigma S-4501), los que se agregan en un matraz kitasato de 2 l con 350 ml de amortiguador para el gel agitándose intensamente hasta lograr su disolución completa, posteriormente se agregan 150 ml de amortiguador precalentado a punto de ebullición, agitándose intensamente hasta lograr la completa mezcla, la que torna a un color opalescente, de consistencia espesa y viscosa. Inmediatamente se aplica vacío durante 45 a 50 segundos, para eliminar al máximo el aire que hubiese quedado atrapado durante la agitación.

Es de gran importancia que previamente se hubiese armado una trampa de vacío (Figura 3a), para retener al máximo los vapores y darle una mayor vida al motor para hacer el vacío. La trampa se arma, colocando un matraz kitasato de 2 l, lleno al menos hasta $\frac{3}{4}$ de su volumen con hielo en escarcha. Se coloca una manguera del motor de vacío hacia la salida del matraz con hielo. Se coloca un tapón horadado, con un tubo de vidrio que penetre al menos unos 5 cm por debajo del nivel de la salida del matraz con hielo, colocándose una manguera de este tubo de vidrio hacia la salida del matraz kitasato que contiene el almidón mezclado, finalmente se coloca un tapón que cierre herméticamente este último matraz.

Existen ligeras diferencias en el procedimiento para solidificar el gel y sembrar las muestras, según el tipo de cámara de electroforesis que se utilice, por tal motivo se describe por separado para el uso de cámaras para mechas y para peines.

Cuando el gel se utilice en cámaras para mechas, se vacía cuidadosamente la mezcla de almidón en un marco de acrílico de 25 x 15 x 1 cm, que se coloca sobre un vidrio, se quitan las burbujas que hubiesen. Finalmente, se coloca con cautela un vidrio sobre el marco de acrílico, que permita darle forma al gel, evitándose se atrapen burbujas de aire (Figura 3 b). Se deja enfriar al menos 4 horas o toda una noche, se recomienda se prepare el gel y se use antes de 24 horas.

Para la colocación de la muestra, primeramente se separa el vidrio que está sobre el marco de acrílico y el mismo marco del gel. Se corta el gel longitudinalmente a unos 4 cm de uno de los extremos (borde catódico), separando con una espátula grande las dos porciones. Se

insertan las mechas de papel Whatman no.3 de 1 x 0.5 cm, saturadas con muestras individuales, así como una mecha empapada con azul de bromofenol al 0.002%, la cual actúa como indicador del corrimiento electroforético. Finalmente se asegura el contacto entre las dos porciones del gel.

En el caso de que el gel se utilice en cámaras con peines, se vacía la mezcla de almidón en la cuba para gel de la cámara de electroforesis, se quitan las burbujas, moviéndose la mezcla de almidón para que se distribuya homogéneamente, posteriormente se colocan los peines en las ranuras del borde catódico, que para tal fin tiene la propia cuba de electroforesis, finalmente se deja enfriar, como se refiere en el párrafo anterior y se retiran los peines.

Las muestras individuales (40 σ l) y el azul de bromofenol, se depositan en cada uno de los pozos que se formaron con los peines, con auxilio de un micropipeteador automático.

Una vez preparado el gel, se coloca en la cámara electroforética correspondiente en contacto con la solución amortiguadora específica para el flujo eléctrico, por medio de papel filtro Whatman no.1, de 25 x 8 cm en las cubas de mechas y de 20 x 6 cm en las cubas de peines (Figura 3 c).

La cámara electroforética se introduce a un refrigerador con puertas de cristal a una temperatura constante de 4 ∇ C, conectándose a una fuente de poder HBI, en la cual se fijan los valores máximos de los parámetros utilizados para el desplazamiento de proteínas (voltaje, amperaje, wattaje y tiempo).

En el caso de las cámaras de mechas, una vez transcurridos 15 minutos del inicio de la electroforesis, se retiran cuidadosamente las mechas de los geles y se asegura el contacto completo entre las dos partes del gel.

Las mezclas histoquímicas de tinción específica se preparan 45 minutos antes del término de la corrida electroforética.

Al término de la corrida electroforética, el gel se rebana en tres capas de 2.5 mm de espesor y se revelan con las soluciones histoquímicas específicas, incubándose a 37 ∇ C, hasta que aparezcan las bandas, momento en el que se elimina la solución histoquímica, se enjuaga con agua destilada y se agrega la solución fijadora. Los geles se pueden conservar en bolsas

de plástico de cierre hermético, considerando que en algunos sistemas de revelado, las bandas pueden ser débiles o bien se pueden pegar las marcas en el plástico.

Para la interpretación de los geles teñidos con las soluciones histoquímicas (zimogramas), se considera la estructura de la proteína revelada (Figura 3d). En los zimogramas se discrimina cuando entre loci génicos la variación de una zona de actividad no afecta a otra. El fenotipo obtenido se interpreta como genotipo, de tal forma que las alelozimas se consideraron alelos y se numeran ascendentemente en el sentido de su movilidad hacia el ánodo, con respecto al alelo más común en *F. p. parvipinnis*, al cual se designó el número 100.

Otra forma para denominarlas es con la designación de los alelos A, B, C, que refiere la distancia alcanzada hacia el ánodo desde el origen, la que es utilizada para analizarla con la opción 1 del programa BYOSIS-1 (Swofford y Selander, 1981).

Preparación de soluciones

A continuación se describen los protocolos y proporciones de mezclas para la preparación de soluciones utilizadas.

Relación de sistemas probados

#	Abreviatura	NOMBRE	Amortiguador	Número*	Número de protocolo
1	AAT	Aspartato aminotransferasa	A	2.6.1.1	1
2	ACP	Fosfatasa acida	D	3.1.3.2	2
3	AKP	Fosfatasa alcalina	G	3.1.3.1	3
4	EST	Esterasa	E	3.1.1.1	4
5	G3PDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	A	1.1.1.8	5
6	G6PDH	Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa	B	1.1.1.49	6
7	GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	E	1.2.1.12	7
8	GDH	Glutamato deshidrogenasa	C	1.4.1.3	8
9	GPI	Glucosa-6-fosfato isomerasa	F	5.3.1.9	9
10	IDHP	Isocitrato deshidrogenasa	A	1.1.1.42	10
11	LAP	Leucine Amino Peptidasa	A	3.4.11.1	11
12	LDH	Lactato deshidrogenasa	A	1.1.1.27	12
13	MDH	Malato deshidrogenasa	D	1.1.1.37	13
14	MEP	Enzima málica	A	1.1.1.40	14
15	ODH	Octanol deshidrogenasa		1.1.1.73	15
16	PEP	Peptidasas	F	3.4.11.13	16
17	PGM	Fosfoglucomutasa	A	5.4.2.2	17
18	MPI	Manosa fosfato isomerasa		5.3.1.8	18

19	PROT	Proteinas generales	F	-----	19
20	SDH	Sorbitol deshidrogenasa		1.1.1.14	20
21	XDH	Xantina deshidrogenasa	C	1.1.204	21

Nota: * el número asignado por la Comisión de Enzimas (IUBNC, 1984).

Solución de homogeneizado.

v	100	Tris- HCl, 0.1 M pH 8	250 ml
p	0.1	NAD	0.25 mg
p	0.1	NADP	0.25 mg
p	1	pvp	2.5 mg

Sistemas enzimáticos

Se indican las cantidades de reactivo para 50 ml (p/50), requeridos para cubrir una rebanada de gel, y para 100 ml (p/100), necesarios para las rebanadas de una cámara de electroforesis.

1. AAT o GOT

Reactivo	p/50	p/100
Solución sustrato AAT	25 ml	50 ml
Agua .dd	25 ml	50
Azul rápido BB	0.125	0.25

Post-uni3n: tomar 5 ml de la mezcla de soluci3n sustrato y agua y agregarle el azul r1pido. Incorporar al gel despu3s de 15 minutos de incubaci3n a 37 °C.

AAT. Soluci3n sustrato pH 7.4

Acido ζ-cetoglut1rico	0.073 g
Acido L-aspartico	0.266g
Polivinilpirrolidona	1.0 g
EDTA- Na ₂	0.1 g
Na ₂ HPO ₄	2.84 g
Agua .dd	100 ml

Se puede almacenar en refrigeraci3n hasta por un mes.

2. ACP

Reactivo	p/50	p/100
1-naftil fosfato 1cido	0.05 gr.	0.1 gr.
Azul r1pido BB	0.05 gr.	0.1 gr.
Acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0	50 ml	100 ml

ACP. Amortiguador de acetato, 0.05 M, pH 5.0

Acetato de sodio	6.804 gr.
------------------	-----------

Agua	1,000 ml
------	----------

Se ajusta a pH 5.0 con ácido acético. Se puede almacenar a temperatura ambiente.

3. AKP

Reactivo	p/50	p/100
1-naftil fosfato ácido	0.025 gr.	0.05 gr.
Azul rápido BB	0.025 gr.	0.05 gr.
MgSO ₄ Anhidro	0.03 gr.	0.06 gr.
Amortiguador de Borato pH 9.7	50 ml	100 ml

AKP. Amortiguador de borato, pH 9.7

Acido Bórico	0.374 gr.
NaOH 1 M	5 ml
Agua .dd	100 ml

Se puede almacenar en refrigeración.

4. EST

Reactivo	p/50	p/100
Azul rápido BB	0.05	0.1
Solución sustrato EST	1.5 ml	3
Tris- HCL 0.5 M pH 7.1	5 ml	10 ml
Agua	43.5	87

EST. Solución sustrato.

1 naftil acetato	0.05 g
2 Naftil acetato	0.05 g
Acetona	2.5 ml
Agua .dd	2.5 ml

Se puede almacenar en refrigeración hasta por quince días, en frasco ambar.

5. G3PDH

Reactivo	p/50	p/100
NAD	0.025 gr.	0.05 gr.
Solución sustrato G3PDH	5 ml	10 ml
MTT 1 %	1.5 ml	3 ml
PMS 0.1 %	1 ml	2 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 7.1	7.5 ml	15 ml
Agua	35 ml	70 ml

G3pdh. Solución sustrato.

DL- ζ -glicerofosfato	1.08 gr.
Agua	5 ml

Se puede almacenar en refrigeración 15 días.

6. G6PDH

Reactivo	p/50	p/100
Glucosa 6 fosfato	0.08 gr.	0.16 gr.
NADP	0.015 gr.	0.030 gr.
MTT 1 %	1 ml	2 ml

	PMS 0.1 %	1 ml	2 ml
	Tris-HCl 0.5 M pH 7.1	12.5 ml	25 ml
	Agua	35.5 ml	71 ml

7. GAPDH.

Reactivo	p/50	p/100
NAD	0.025	0.05
Arseniato de sodio	0.09g	0.18
Solución sustrato GAPDH	5 ml	10 ml
MTT 1 %	1.5 ml	3
PMS 0.1 %	1 ml	2
Tris-HCl 0.5 M, pH 7.1	10 ml	20
Agua	32.5	65

GAPDH. Solución sustrato.

D-fructuosa 1, 6 difosfato	0.273 g
Aldolasa	0.09 ml
Tris- HCl 0.5 M, pH 7.1	2 ml
Agua	3 ml
Mezclar e incubar a 37 ° C por 30 minutos	

8. GDH

Reactivo	p/50	p/100
NAD	0.025 gr.	0.05 gr.
Solución sustrato GDH	2.5 ml	5 ml
MTT 1 %	1.5 ml	3 ml
PMS 0.01 %	1 ml	1 ml
Amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.0	12.5 ml	25 ml
Agua .dd	32.5 ml	65 ml

GDH. Solución sustrato.

Glutamato de sodio	0.2125 gr.
Amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.0	5 ml
Se puede almacenar en refrigeración hasta por un mes.	
Amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.0	
Solución A.	
Na ₂ HPO ₄ (Anhidro).....	3.549 g
Agua dd.....	50 ml
Solución B	
NaH ₂ PO ₄ (monohidratado)	3.45 g
Agua dd.....	50 ml
Ajustar el pH a 7.0, titulado la solución B con la A. Se puede almacenar cada una de las soluciones a temperatura ambiente.	

9. GPI

Reactivo	p/50	p/100
D-fructuosa 6 fosfato	0.08 gr.	0.16 gr.
NADP	0.005 gr.	0.010 gr.

	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100u/ml)	0.8 ml	1.6
	MTT 1 %	0.5 ml	1 ml
	PMS 0.1 %	0.5 ml	1 ml
	Tris-HCl 0.1 M, pH8.0	48.2 ml	96.4 ml

GPI. Preparación de sustrato alterno.

	Reactivo	30 ml	60
	Fructose 6 fosfato	0.02 gr.	0.04 gr.
	NADP	0.004 gr.	0.008 gr.
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 ml	0.04 ml
	MTT	0.007 gr.	0.014 gr.
	Glucosa 6 fosfato dehydrogenasa	20 u	40 u
	PMS	0.002 gr.	0.004 gr.
	Tris HCl 0.1 M, pH 8.0	30 ml	60 ml

10. IDHP

	Reactivo	p/50	p/100
	Isocitrato de sodio	0.07 gr.	0.14 gr.
	NBT	0.01 gr.	0.02 gr.
	NADP	0.015 gr.	0.030 gr.
	MgCl ₂ 10%	0.2 ml	0.4 ml
	PMS 0.1 %	1 ml	2 ml
	Tris-HCl 0.1 M, pH8.0	48.8	97.6

11. LAP

	Reactivo	p/50	p/100
	Sal rápida negra K	0.025	
	L-leucil η naftilamida	0.010	
	Tris-maleato pH 6.0	25 ml	
	Agua	25 ml	

Antes de agregar la solución sustrato, se deja incubar el gel en ácido bórico 0.5 m por 20 minutos a temperatura ambiente.

LAP. Solución tris-Maleato, pH6.0

Solución A	
Tris	24.2 gr.
Acido maléico	23.2 gr.
Agua	1,000 ml
Se puede mantener en refrigeración durante seis meses.	
Solución B (Hidróxido de sodio 0.2 M)	
Hidróxido de sodio	8 gr.
Agua	1,000 ml
Se almacena a temperatura ambiente.	
Se mezcla 50 ml de la solución A con 26 ml de la solución B y se afora a 200 ml con agua. Posteriormente se ajusta el pH a 6.0.	

12. LDH

	Reactivo	p/50	p/100
--	----------	------	-------

	NAD	0.025 gr.	0.05 gr.
	Solución sustrato LDH	5 ml	10 ml
	MTT 1 %	1.5 ml	3 ml
	PMS 0.1%	1 ml	2 ml
	Tris-HCl 0.5 M, pH 7.1	35 ml	70 ml

LDH. Solución sustrato.

Acido láctico 80 %	0.562 g
Na ₂ CO ₃ 1 M	2.45 ml
Agua .dd	1.987 ml

Se puede almacenar en refrigeración en recipiente ámbar, hasta por un mes.

13. MDH

Reactivo	p/50	p/100
Solución sustrato MDH	10 ml	20 ml
NAD	0.05 gr.	0.1 gr.
MTT 1%	1.5ml	3 ml
PMS 0.1%	1 ml	2 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 7.0	5 ml	10 ml
Agua	37.5ml	74 ml

MDH. Solución sustrato.

DL-ácido málico	13.4 g
Na ₂ CO ₃ , 2 M	49 ml
Agua dd	51 ml

Ajustar a pH 7.0. Se puede almacenar en refrigeración hasta por un mes.

14. MEP

Reactivo	p/50	p/100
NADP	0.01 gr.	0.02 gr.
NBT	0.01	0.02 gr.
Solución sustrato MDH	2.5 ml	5 ml
PMS 0.1%	10 ml	20 ml
MgCl ₂ 10 %	0.1 ml	0.2
Tris-HCl 0.1 M pH 8.4	10 ml	20 ml
Agua	27.5 ml	55 ml

15. ODH

Reactivo	p/50	p/100
NADP	0.0125 gr.	0.025 gr.
Solución sustrato ODH	0.5 ml	1 ml
MTT 1 %	1 ml	2 ml
PMS 0.1%	2.5 ml	5 ml
Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4	46 ml	92 ml

ODH. Solución sustrato.

1-octanol	1 ml
Etanol	4 ml

Se puede almacenar en refrigeración hasta por seis meses.

16. PEP

Reactivo	p/40	p/80
Peptido- (Leu-Gly-Gly) gr.-	0.04 gr.	0.08 gr.
Peroxidasa	0.02 gr.	0.04 gr.
L-amino acido oxidasa	0.01 gr.	0.02 gr.
O-dianisidine	0.01 gr.	0.02 gr.
Tris HCl 0.1 M, pH 8	40 ml	80 ml

Se combina con solución de agar hervido, agitándose intensamente.

La solución de agar, se prepara hirviendo 0.8 gr. de agar en 30 ml de tris HCL 0.1 M pH 8, después se deja enfriar a unos 30 °C, se mezclan los reactivos agitándose y se agrega sobre la superficie del gel. Se incuba a temperatura ambiente hasta que las bandas aparezcan.

17. PGM

Reactivo	p/50	p/100
ζ-D-Glucosa 1 fosfato	0.25 gr.	0.5 gr.
EDTA- Na ₂	0.025 gr.	0.05 gr.
NBT	0.01 gr.	0.02 gr.
NADP	0.005 gr.	0.01 gr.
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100 u/ml)	0.4 ml	0.8 ml
MgCl ₂	0.1 ml	0.2 ml
PMS 0.1 %	1 ml	2 ml
Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1	48.5 ml	97 ml

18. MPI

Reactivo	p/35	p/70
Manosa 6 fosfato	0.02 gr-	0.04 gr.
NADP	0.005 gr.	0.01 gr.
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	20 unidades	40 unidades
Glucosa fosfato isomerasa	21 unidades	42 unidades
MTT	0.005 gr.	0.01 gr.
PMS	0.002 gr.	0.004 gr.
Cloruro de magnesio (hexahidratado)	0.02 gr.	0.04 gr.
Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0	20 ml	40 ml.

Se calienta a punto de ebullición por separado 0.4 gr. de agar en 15 ml. de Tris-HCl (1 M, pH8.0), después se mezcla con la solución, agitándose. El líquido se dispersa sobre la superficie y se incuba hasta que las bandas aparezcan. Puede requerirse guardarse a temperatura ambiente en obscuridad, durante toda la noche.

19. PROT

Solución de Azul de Coomasie, 2.5 %

Azul de coomasie	1.25 g
Metanol	227 ml
Acido acético	46 ml
Agua dd	227 ml

Se puede almacenar a temperatura ambiente.

1. Cubrir el gel con azul de Coomasie 2.5%, por una hora.
2. Enjuagar con solución fijadora y desteñidora y dejar 24 horas en esta solución.

20. SDH

Reactivo	p/50	p/100
Sorbitol	0.25 gr.	0.5 gr.
NAD	0.005 gr.	0.01 gr.
MTT 1%	0.7 ml	1.4 ml
PMS 0.1 %	1 ml	2 ml
Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0	48.3 ml	96.6 ml

21. XDH

Reactivo	p/50	p/100
Hipoxantina	0.05 gr.	0.10 gr.
Tris-HCl 0.5 M, PH 7.0	5 ml	10 ml
Disolver perfectamente y mezclar con:		
NAD	0.015 gr.	0.03 gr.
MTT 1 %	1 ml	2 ml
PMS 0.1 %	1 ml	1 ml
Agua	43 ml	86 ml

Solución fijadora y desteñidora.

Metanol	600 ml
Acido acético	200 ml
Agua	1,200 ml

Amortiguadores para electroforesis.

Amortiguador A pH 8.0.

Electrodo	Tris	0.687 M
	Ac. cítrico	0.157 M
Gel	Tris	0.0229 M
	Ac. cítrico	0.0052 M

Amortiguador B, pH 7.4

Electrodo	Tris	0.10 M
	Acido maleico	0.10 M
	EDTA-Na ₂	0.01 M
	Cloruro de Magnesio	0.01 M
Gel	Dilución 1:9 del amortiguador para electrodo.	

Amortiguador C, pH 8.0.

Electrodo	Tris	0.5 M
	Acido bórico	0.65 M
	EDTA-Na ₂	0.016 M
Gel	Tris	0.05 M
	Acido bórico	0.097 M
	EDTA-Na ₂	0.0016 M

Amortiguador D pH 7.0.

Electrodo	Tris	0.135 M
	Ac. cítrico	0.045 M
Gel	Tris	0.009 M
	Ac. cítrico	0.003

Amortiguador E, pH 6.1.

Electrodo	Acido cítrico	0.04 M
	Se estabiliza el pH con amino propil morfolina	
Gel	Acido cítrico	0.002 M
	Se estabiliza el pH con amino propil morfolina	

Amortiguador F (Poulik.- Discontinuo)

Electrodo; pH 8.2	Ac. Bórico	0.3 M	(37.10 gr. en 2 l)
	Na OH	0.06M	(4.8 gr. en 2 l)
Gel ; pH 8.7	Tris	0.076M	(18.4 gr. en 2 l)
	Ac. cítrico	0.005 M	(1.92 gr. en 2 l)

Amortiguador G , pH 9.0.

Electrodo	Tris	0.087 M
	Ac. bórico	0.087 M
	EDTA-Na ₂	0.001 M
Gel	El mismo que el electrodo	

Soluciones stock.

Solución PMS. 0.1 %

PMS.....50 mg
Agua 50 ml
Se puede almacenar en refrigeración hasta por quince días, protegiéndose de la luz.

Solución MTT 1 %

MTT 1 g
Agua 100 ml
Se puede almacenar en refrigeración hasta por quince días protegiéndose de la luz.

Solución de MgCl₂ al 10 %.

MgCl ₂ 10 g
Agua 100 ml
Se puede almacenar a temperatura ambiente.

Relación Amortiguador-sistema

#		NOMBRE	Amortiguador	T
1	AAT	Aspartato aminotransferasa	A	
2	ACP	Fosfatasa acida	D	
3	AKP	Fosfatasa alcalina	G	
4	EST	Esterasa	E	
5	G3PDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa		
6	G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	B	
7	GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	E	
8	GDH	Glutamato deshidrogenasa	C	
9	GPI	Glucosa-6-fosfato isomerasa	F	
10	IDHP	Isocitrato deshidrogenasa	A	
11	LAP	Leucine Amino Peptidasa		
12	LDH	Lactato deshidrogenasa	A	
13	MDH	Malato deshidrogenasa	D	
14	MEP	Enzima málica	A	
15	ODH	Octanol deshidrogenasa		
16	PEP	Peptidasas	F	
17	PGM	Fosfoglucomutasa	A	
18	PROT	Proteinas generales	F	
19	SDH	Sorbitol deshidrogenasa		
20	XDH	Xantina deshidrogenasa	C	

ANEXO 4

El estudio del ADN mitocondrial en genética de poblaciones tiene diversas ventajas, como su herencia matrilineal, conservación en el orden y composición de los genes, tasa de divergencia rápida, etc., lo que permiten efectuar estudios filogeográficos (Avise, 1994).

En estudios poblacionales una metodología común para ADN mitocondrial es el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Esta técnica involucra la extracción de ADN, que posteriormente es cortado con una o más endonucleasas, resultando fragmentos de diferentes tamaños que son separados por sus pesos moleculares mediante técnicas electroforéticas (Grijalva-Chon, 1995).

Las aplicaciones del RFLP de ADN mitocondrial son diversas en genética de poblaciones, e incluyen identificación de stocks (Brown y Chapman 1991), la definición de poblaciones y análisis filogeográficos (Avise, 1994).

Esta metodología se recomienda para estudios poblacionales en especies cercanas y grupos conespecíficos (Avise, 1994; Park y Moran, 1994), como es el caso de los fundúlidos.

Para llevar a cabo el RFLP se pueden seguir tres estrategias principales: 1) aislar y cortar directamente el fragmento de ADN que se desea evaluar, 2) preparar una sonda específica con la que posteriormente se visualiza con el ADN de interés mediante procedimientos de hibridación, y 3) amplificar una región específica del ADN mitocondrial mediante reacciones de polimerasa en cadena (PCR-RFLP) (Hillis *et al.*, 1990).

En la elección de la estrategia a seguir es determinante la cantidad y calidad del tejido del cual se efectuará la extracción del ADN. En los vertebrados, los tejidos ricos en ADN mitocondrial son los de hígado, corazón, cerebro, ovarios y riñones (White y Densmore III, 1994).

Como se indicó en los informes anteriores, en *F. lima* se encontró alta incidencia del nemátodo parásito *Contraceacum multipapillatum* (aproximadamente el 80% de las muestras), alojado en los tejidos ricos en mitocondrias (hígado, corazón, gónadas), por tanto, fue necesario emplear el tejido, lo que implicó un rendimiento proporcional a la pobreza de mitocondrias en dicho tejido, por lo que no fue posible aplicarlo al análisis filogeográfico de los fundúlidos de la península de Baja California.

Métodos

Durante la realización del presente trabajo se probaron diversas metodologías para RFLP, incluyendo: 1) aislamiento de ADN mitocondrial; 2) pruebas de hibridación y 3) PCR-RFLP. La información relativa a los protocolos probados se obtuvo de los métodos estandarizados en el laboratorio de Biología Molecular (Grijalva-Chon *et al.*, 1995), los protocolos reportados bibliográficamente (Hoezel, 1992; Sambrook *et al.*, 1989; Hillis *et al.*, 1996; Avise, 1994) y de las técnicas recomendadas por los fabricantes de reactivos y equipos utilizados en el laboratorio (Boehringer Mannheim, Bio Rad, Sigma, Gibco). En la sección final de este anexo se presentan los protocolos en los que se obtuvieron los mejores resultados de las diversas pruebas.

Resultados y discusión

Aislamiento de ADN mitocondrial.

La cantidad de musculo axial disponible por organismo fue un factor limitante. En los ensayos preliminares con los organismos de mayores tamaños (70-80 mm de longitud patrón) se obtuvo aproximadamente 4 gr. de tejido y en los de menores tallas (33 mm de longitud patrón) hasta un gramo. Como se indicó en la metodología del trabajo, la recolecta no fue selectiva del tamaño, obtuyéndose en consecuencia organismos de diferentes tallas, en el intervalo de 33.6 a 82.6 mm de longitud patrón.

La heterogénea y escasa cantidad de tejido disponible, además de la pobreza en mitocondrias del músculo implicó un bajo rendimiento de ADN mitocondrial por organismo, consecuentemente solo fue posible obtener el ADN necesario para probar una a tres enzimas de restricción.

Para un análisis genético poblacional es recomendado utilizar al menos 10 a 20 diferentes enzimas de restricción, que permitan revelar de 50 a 100 fragmentos de restricción por individuo (Avise, 1994), por lo que aplicando el protocolo estandarizado (protocolo 2), no brinda la información requerida para determinar la variabilidad genética de los fundúlidos recolectados.

El protocolo estandarizado se recomienda para análisis en poblaciones donde la cantidad y calidad de tejido disponible por organismo no sea un factor limitante.

Pruebas de hibridación

El análisis de RFLP mediante el uso de una sonda específica, con la que se visualiza el ADN de interés incluye: obtener y etiquetar una sonda específica de ADN mitocondrial, digerir el ADN total de las muestras con cada una de las endonucleasas a utilizar, efectuar una electroforesis de los productos de la digestión, transferir el ADN del gel a una membrana de nylon y efectuar una hibridación con la sonda que nos permite marcar el ADN de interés.

Una estrategia para etiquetar el ADN es mediante la incorporación de Digoxigenina-11-dUTP (DIG-dUTP), disponible en un paquete comercial de la compañía "Böehringer Mannheim". La principal ventaja en el uso de este paquete es que suple a los marcadores radioactivos.

La sonda se hibridiza con ADN total inmovilizado. Posteriormente se detecta el ADN de interés con un conjugado enzima - anticuerpo y se produce una reacción de catálisis con la formación de un precipitado coloreado, el cual se puede visualizar directamente.

Sonda de *Sebastes* sp.

A partir de hígado de *Sebastes* sp., mediante el protocolo para la obtención de ADN mitocondrial para ser utilizado como sonda específica (protocolo 2) se obtuvo suficiente cantidad y calidad de ADN.

El ADN se marcó con digoxigenina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Boheringer Manheim), estimándose la concentración en 1 ng/l (protocolo 5).

Para evaluar la utilidad de la sonda en el análisis de los fundúlidos, se utilizó la metodología de "Dot Blot"(protocolo 6), en la que diferentes muestras de ADN se hibridizan con la sonda y se produce una reacción de color, lo que permite determinar tanto la especificidad de la sonda como la cantidad de ADN requerido.

Los resultados resumidos en la Tabla 4a, mostraron que la sonda preparada no hibridizó con el ADN de los fundúlidos peninsulares en cantidades detectables, por lo cual no es recomendable utilizarla en el análisis de variabilidad de los fundúlidos.

Sonda de *Fundulus lima*

El protocolo 2 se aplicó a muestras combinadas de fundúlidos, para incrementar la cantidad de tejido muscular a 10 gr. Después de efectuar una electroforesis a las muestras, las bandas visualizadas en el transiluminador mostraron una baja calidad del ADN mitocondrial, lo que se asocio con posible contaminación de ADN nuclear, por lo que se efectuaron nuevas modificaciones a dicho protocolo.

Las principales modificaciones consistieron en incrementar la cantidad de tejido, incorporar adicionalmente una electroforésis (50 V por 3 horas) del ADN obtenido y que a partir del gel resultante, se separó la banda correspondiente al ADN mitocondrial, la cual se purificó con el sistema comercial GlassMAX (Gibco, no. cat. 15590-060) (protocolo 2b).

Con las modificaciones efectuadas se logró obtener ADN mitocondrial a partir de tejido muscular de organismos frescos, con la calidad requerida para elaborar la sonda específica..

El ADN mitocondrial se marcó con digoxigenina (protocolo 5) y se obtuvo una concentración estimada de 1.32 ng/ ul. Posteriormente, se evaluó su utilidad mediante "Dot Blot" (protocolo 6), con los resultados resumidos en la Tabla 4b.

Digestión del ADN total

Con el ADN total obtenido con el método de cloroformo-alcohol (protocolo 3) y el etil-eter (protocolo 4), fueron probadas 20 endonucleasas (Tabla 4c y protocolo 7c). Por medio de electroforesis en agar al 1 % (protocolo 1b) se contrastaron cualitativamente las digestiones, observandose en todos los casos patrones de manchas similares a los típicos de las digestiones de ADN total. Es importante aclarar que en este caso no se obtienen bandas claramente definidas sino patrones de manchas, con mayores intensidades en forma de bandas, en unas porciones.

De las muestras de ADN probadas, las obtenidas con el protocolo 3 presentaron una mejor resolución, además de una mayor consistencia en los resultados de la extracción, por lo que dicho protocolo se utilizó en las subsecuentes pruebas.

Transferencia del ADN.

Para la transferencia del ADN, desde el gel de agarosa hacia la membrana de nylon, se utilizó un equipo “vacuum blotter”. Con dicho equipo se efectuó la transferencia aplicando vacío (protocolo 7c). El resultado de la transferencia se verifica agregando bromuro de etidio fresco al gel y visualizándolo en un transiluminador U.V.

En la transferencia se contrastó el efecto de solo la desnaturalización previa a la transferencia contra la inclusión de una depuración ácida (con HCl 0.25N) anterior a la desnaturalización, lográndose una mejor transferencia con la depuración ácida.

Hibridación.

Las pruebas de hibridación se efectuaron con diferentes concentraciones de sonda, tiempos y temperaturas, no lográndose obtener patrones definidos de bandas, lo que se relacionó con la baja cantidad de ADN mitocondrial presente en las muestras de ADN total.

En síntesis, de las concentraciones de sonda se probó con 5, 15 y 25 ng/ml, obteniéndose una mejor reacción de color con las mayores concentraciones. En referencia a los tiempos de prehibridación se contrastó el efecto de 1 y 4 horas, con mejores resultados en 4 horas. En la hibridación se probó 12, 16 y 20 horas, no encontrándose diferencias significativas entre las 16 y 20 horas. Finalmente de la temperatura se comparó con 68°C y 65°C, resultando más inespecífica la menor temperatura.

Para las pruebas se utilizó ADN total de *Fundulus* sp. sin digerir y digerido con las endonucleasas, ADN mitocondrial sin digerir obtenido de un mamífero (control negativo), de calamar (control negativo), de *Sebastes* sp. y de *Fundulus* sp. Como escalera se utilizó fago ϕ digerido con HindIII y marcado previamente con digoxigenina.

En las mejores condiciones de hibridación y revelado (protocolo 7d y e) resultó un patrón definido de bandas en la escalera, una banda en ADN mitocondrial de *Fundulus* sp. y de *Sebastes* sp. Contrastantemente con el ADN total sin digerir se obtuvo una sutil mancha aproximadamente entre los 15 y 17 Kpb. Del ADN total digerido se obtuvieron sutiles manchas, que dependiendo de la endonucleasa, se encontraba entre los 0.5 y 15 Kpb, sin mostrar patrón de bandeó.

PCR-RFLP

Considerando los resultados negativos en la preparación de una sonda específica para el estudio de los fundúlidos, se exploraron las metodologías del PCR- RFLP.

En la reacción en cadena de polimerasa es posible obtener grandes cantidades de una molécula específica por amplificación enzimática de una región que se encuentra entre dos secuencias conocidas.

La reacción se efectúa en un termociclador que brinda sucesivamente temperaturas que desnaturalizan, permiten se incorporen los cebadores ("primers") a las secuencias de los flancos conocidas y produce la extensión a partir de los cebadores por una polimerasa resistente al calor.

Para una amplificación eficiente se requieren cuidados especiales de diversos factores, como: la secuencia del cebador, concentración de cada componente de la reacción y las condiciones del termociclador para la amplificación.

Es importante designar la región a amplificar en función del carácter informativo que nos pueda brindar y el conocimiento previo de secuencias altamente conservadas en los flancos de dicha región.

En relación al cebador para el PCR-RFLP, algunas regiones del genoma son suficientemente conservadas, en las que su secuencia es esencialmente la misma en un amplio espectro de organismos y se designan como cebadores universales.

Un fragmento de interés en estudios poblacionales es la región control del ADNmit, ya que es sumamente variable y nos brinda información genético-poblacional. Para mamíferos y peces, se ha reportado un cebador universal (Tabla 4d) que permite la amplificación de 1 Kb (Hoezel y Green, 1992), siendo su tamaño adecuado para utilizarlo en RFLP.

Buscando disminuir al máximo las variables relacionadas con la concentración de los componentes de reacción, se utilizó un juego comercial "PCR-Super Mixer (Gigco no. cat. 10572-014)", en el cual se tienen estandarizadas las concentraciones de los reactivos (dNTPs, Taq polimerasa, amortiguador y cloruro de magnesio).

Se contrastaron los efectos en diferentes concentraciones de los cebadores, ADN de *Fundulus* spp., temperaturas y concentraciones de cloruro de magnesio (Tabla 4d). En las pruebas se utilizó como control positivo ADN total de un mamífero marino y como control negativo la mezcla sin ADN.

Con el propósito de descartar la posibilidad de tener baja calidad en el ADN total de las muestras, se probaron diferentes cebadores diseñados para RAPDs, obteniéndose resultados satisfactorios en todas las pruebas, y demostrándose a su vez la utilidad del ADN total de los fundúlidos para el PCR-RFLP.

Para los fundúlidos, en las mejores condiciones, se obtuvieron como resultado dos bandas muy sutiles menores de 300pb, en condiciones poco restrictivas de amplificación (menor T_m , mayor concentración de magnesio y tiempos extendidos), lo que indica que probablemente se estuvo amplificando una región diferente a la deseada. Adicionalmente, en el control positivo se amplificaron otras bandas, que indican condiciones subóptimas para los cebadores.

Protocolos.

Protocolos que sintetizan los resultados de la estandarización. Se considera la extracción de ADN mit: 1) a partir de tejidos ricos en mitocondrias y 2) para la elaboración de la sonda específica para su uso en hibridaciones; extracción de ADN total 3) para ser utilizado en PCR-RFLP y 4) en hibridación. Adicionalmente los protocolos de 5) marcado de sonda 6) prueba de "Dot blot" y 7) hibridación.

1) Extracción de ADN mit. a partir de tejidos ricos en mitocondrias .

Recomendado para el análisis de RFLP, en los casos que se cuente por individuo con al menos de 3 a 5 gr. de tejido rico en mitocondrias (hígado o gónadas maduras).

a) Extracción de ADN mitocondrial.

1. Con un homogeneizador de aspas se homogeneiza el tejido en dos volúmenes de TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%). Durante el homogeneizado mantenga la muestra en hielo y evite la formación de espuma (característica de un exceso de molido).

2. Subyaciendo a la muestra agregue lentamente un volumen de TEK-15% sacarosa.
3. Centrifugue (1,500 x g por 10 min. a 4°C) y obtenga el sobrenadante.
4. Repita el paso 2 y 3.
5. Centrifugue a 18,000 x g durante 1 hora a 4 °C. Elimine el sobrenadante. .
6. Resuspenda el precipitado con 10 ml de TEK y repita la centrifugación por 30 minutos.
7. En caso de que el sobrenadante este turbio o con pigmentos, repita el paso 6.
8. Resuspenda el precipitado con TEK (0.9 ml por cada 5 gr. de tejido inicial).
9. Agregue Igepal al 10% (en TEK), para obtener una concentración final en la muestra de Igepal al 1%.
10. Agite suavemente por 15 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugue a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C y recoja el sobrenadante.
12. Agregue 1 volumen de fenol equilibrado (pH 8.0) y agite suavemente durante 5 minutos.
13. Centrifugue a 12,000 x g por 10 minutos y recoja la fase acuosa. Se recomienda ser muy cuidadoso, para evitar tomar partículas de la interface.
14. Repita los pasos 12 y 13.
15. Agregue un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (v:v:v 25:24:1) y agite suavemente unos segundos.
16. Centrifugue a 12,000 x g por 10 minutos. Recoja el sobrenadante.
17. Agregue un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (v:v 24:1) y agite suavemente unos segundos.
18. Centrifugue a 12,000 x g por 10 minutos y recoja el sobrenadante.
19. Agregue un octavo del volumen de acetato de sodio 3 M (pH 4.8).
20. Agregue dos volúmenes de alcohol etílico absoluto a -20°C.
21. Guardar la muestra en congelador (-20°C) y esperar una noche.

22. Centrifugue a 12,000 x g por 10 minutos y tire con cuidado el sobrenadante.
23. Agregue dos volúmenes de alcohol etílico al 70% a -20°C (volumen equivalente al del paso 20).
24. Centrifugue a 12,000 x g por 10 minutos y tire con cuidado el sobrenadante.
25. Seque el precipitado a 37°C.
26. Resuspenda en 200 μ l (por cada 5 gr. de tejido inicial) de amortiguador TE- RNasa (solución 10x = Acetato de sodio 1M pH 4.8; EDTA 0.05M pH 4.8; RNasa A 0.1 gr. por cada 10 ml; se almacena a -20°C).
27. Consérvese en congelación (-20°C) hasta su uso.

Electroforesis.

Para verificar el producto se recomienda la aplicación de una electroforesis en gel de agar al 0.8 %. Considerando que se trabaja con bromuro de etidio incorporado al gel se recomienda utilizar guantes en todos los subsecuentes pasos.

1. En la preparación del gel para las cámaras de electroforesis chicas (minisub), coloque en un matraz erlenmeyer 0.24 gr. de agar y agregue 20 ml del amortiguador TAE 1x.
2. Coloque el matraz en un termoplato con la máxima temperatura y agitación constante, hasta que inicie la ebullición.
3. Agregue 10 ml de amortiguador TAE 1x y 1.5 μ l de bromuro de etidium. Agite hasta la homogeneización del agar.
4. Retire el matraz del termoplato y espere hasta que alcance aproximadamente los 30 $^{\circ}$ C.
5. Transfiera el agar a la charola de electroforesis y coloque los correspondientes peines.
6. Después de 30 minutos, con el agar solidificado, retire con cuidado los peines.
7. Coloque la charola en la cámara de electroforesis.

8. Agregue a la cámara 300 ml de amortiguador TAE 1x (hasta que se cubran los pozos con el amortiguador).
9. En un tubo de centrifuga o sobre parafilm, coloque 8 σ l de la muestra*.
10. Agregue 2 σ l de Azul de bromofenol y agua destilada para llevar el volúmen final a 12 σ l.
11. Con el pipeteador automático homogeneice la muestra y transfiera a uno de los pozos del gel de agar.
12. Repita los pasos 9 a 11 con el resto de las muestras dejando al menos un pozo para colocarla escalera del ζ digerido con HindIII, según las instrucciones del fabricante.
13. Encienda la fuente de poder programando el voltaje constante entre 2 y 5 V/cm. Con el menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas, especialmente con fragmentos chicos.
14. Permita que avance la electroforesis hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 de la distancia del gel.
15. Apague la fuente de poder y retire cuidadosamente el gel.
16. Visualice el resultado de la electroforesis en un transiluminador U.V.

* La cantidad de muestra que se agregue variara dependiendo de la concentración de ADN. En la visualización cuando se agrego un exceso de ADN se observan aberraciones dendriticas en la muestra, por el contrario si se agrega una baja concentración no se observara el ADN.

2) Protocolo para la obtención de ADNmit para ser utilizado como sonda específica.

Recomendado para el análisis de RFLP mediante hibridación, en los casos que se cuente por individuo con al menos de 3 gr. de tejido rico en mitocondrias (hígado o gónadas maduras) o más de 5 gr. de tejido muscular.

A) Obtención de ADN mit

1. Homogenice el tejido en dos volúmenes de TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%).
2. Centrifugue a 1,000 x g durante 10 minutos a 4 °C y recoja el sobrenadante.
3. Centrifugue a 3,000 x g durante 10 minutos a 4 °C y recoja el sobrenadante.
4. Centrifugue a 5,000 x g durante 10 minutos a 4 °C y recoja el sobrenadante.
5. Subyaciendo a la muestra agregue un volumen de TEK-15% sacarosa.
6. Centrifugue a 5,500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante.
7. Centrifugue a 18,000 x g durante 1 hora a 4 °C. Elimine el sobrenadante.
8. Resuspenda el precipitado con 10 ml de TEK y repita la centrifugación por 30 minutos. Elimine el sobrenadante.
9. Resuspenda el precipitado en un volumen de TEK.
10. Con un formador de gradientes en un tubo de ultracentrífuga prepare un gradiente TEK-Sacarosa con concentraciones de 0.8 M a 2 M.
11. Agregue cuidadosamente sobre el gradiente el precipitado resuspendido sin perturbar las fases.
12. Centrifugue a 80,000 xg por dos horas a 4 °C.
13. Recoja cuidadosamente la banda de mitocondrias, de color anaranjado, que se encuentra aproximadamente en la concentración 1 M. Las fases bandas que se encuentran de la superficie al fondo son a) lípidos y grasas, b) mitocondrias, c) nucleos y d) debris, separadas unas de otras por una capa transparente.
14. Resuspenda en dos volúmenes de TEK y centrifugue a 20,000 xg durante 30 minutos a 4°C.
15. Elimine el sobrenadante y resuspenda el precipitado en un volumen de TEK. Para verificar la presencia de las mitocondrias, tome una gota, tiñala con verde de malaquita y observe al microscopio.
16. . Agregue Igepal al 10% (en TEK), para obtener una concentración en la muestra de Igepal al 1%.

17. Agitar suavemente por 15 minutos a temperatura ambiente.
18. Centrifugue a 13,000 x g por 10 minutos a 4 °C y recoja el sobrenadante.
19. Agregue 1 volumen de fenol equilibrado, pH 8.0, y agite suavemente durante 5 minutos.
20. Centrifugue a 13,000 x g por 15 minutos y recoja la fase acuosa. Se recomienda ser muy cuidadoso, para evitar tomar partículas de la interface.
21. Repita los pasos 13 y 14.
22. Agregue un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (v:v:v 25:24:1) y agite suavemente unos segundos.
23. Centrifugue a 13,000 x g por 10 minutos. Recoja el sobrenadante.
24. Agregue un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (v:v 24:1) y agite suavemente unos segundos.
25. Centrifugue a 13,000 x g por 10 minutos y recoja el sobrenadante.
26. Agregue un octavo del volumen de acetato de sodio 3 M (pH 4.8).
27. Agregue dos volúmenes de alcohol etílico absoluto a -20°C.
28. Guardar la muestra en congelador (-20°C) y esperar una noche.
29. Centrifugue a 13,000 x g por 15 minutos y tire con cuidado el sobrenadante.
30. Agregue dos volúmenes de alcohol etílico al 70% a -20°C (volumen equivalente al del paso 27).
31. Centrifugue a 13,000 x g por 10 minutos y tire con cuidado el sobrenadante.
32. Seque el precipitado a 37°C.
33. Resuspenda en 200 μ l (por cada 5 gr. de tejido inicial) de amortiguador TE- RNasa.

b) Purificación del ADN mitocondrial.

Recomendado en los casos en que se obtenga ADN mitocondrial de baja calidad por contaminación de ADN nuclear.

1. La muestra se corre en una electroforesis en gel de agar (0.8%) con 2.5 V/ cm.
2. El ADN mitocondrial se visualiza con Bromuro de Etidio en un transiluminador y con las precauciones adecuadas se corta del gel, la banda correspondiente a 17 kpb, con una navaja estéril y se recoge en un tubo prepesado de 1.5 ml.
3. Del paquete comercial “Glass Max” se agregan 450 μ l de “Binding solution” por cada 100 mg de muestra.
4. La muestra se calienta a 50 ^\circ C con agitación suave hasta que el gel este disuelto.
5. En porciones de 600 μ l, se transfiere a los tubos con filtro de “Glass Max”.
6. Centrifugue a 13,000 x g por 20 segundos a temperatura ambiente.
7. El sobrenadante se descarta. Si resultaron dos o más porciones de la muestra se repiten los pasos 5-7 las veces necesarias.
8. El filtro se lava con “Washing solution” y se centrifuga a 13,000 xg por 20 segundos a temperatura ambiente, descartándose posteriormente el líquido.
9. El paso 8 se repite 2 veces más.
10. El filtro se centrifuga a 13,000 xg por 20 segundos. Posteriormente se cambia de tubo.
11. Al filtro se le agregan 40 μ l de TE 0.1x a 65 ^\circ C y centrifugue a 13,000 xg por 20 segundos.

3) Extracción de ADN total para ser utilizado en PCR-RFLP.

1. Se cortan muy finamente 100 mg de tejido, evitando las escamas y huesos.
2. En un tubo con tapa se agregan 400 μ l del amortiguador STE (Tris-HCL M pH ; EDTA M y NaCl M), 40 μ l de SDS al 20% y 40 μ l de proteinasa K.
3. Se deja en agitación suave por 18 a 20 horas (Proteinasa K de la compañía sigma), a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 5,000 x g por 5 minutos, se recoge con cuidado el sobrenadante y se descarta el precipitado.

5. Agregar 400 σ l de fenol estabilizado, agitándose hasta la formación de la emulsión.
6. Centrifugar a 12,000 x g por 15 minutos. Se recoge la fase acuosa.
7. Repetir pasos 5 y 6.
8. Agregar 400 σ l de Cloroformo- Alcohol isoamílico- fenol, agitándose suavemente.
9. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se recoge el sobrenadante.
10. Agregar 400 σ l de Cloroformo- Alcohol isoamílico, agitándose suavemente.
11. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se recoge el sobrenadante.
12. Repetir pasos 10 y 11.
13. Agregar 1/8 del volumen de acetato de sodio 4M.
14. Agregar 2 volúmenes de Alcohol etílico.
15. Dejar en reposo 12 a 16 hr a -20°C.
16. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se tira el líquido suavemente, sin perturbar el precipitado.
17. Agregar 400 σ l de Alcohol etílico al 70%.
18. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se elimina el líquido suavemente, sin perturbar el precipitado.
19. Secar el precipitado a 37°C.
20. Agregar 200 σ l de TE-RNAasa.
21. Conservar a -20°C.

4) Extracción de ADN total para ser utilizado hibridación.

1. Se cortan muy finamente 100 mg de tejido, evitando las escamas y huesos.
2. En un tubo con tapa se agregan 500 σ l del amortiguador STE (Tris-HCL M pH ; EDTA M y NaCl M), 50 σ l de SDS al 20% y 40 σ l de proteinasa K.
3. Se deja en agitación suave por 18 a 20 horas, a temperatura ambiente.

4. Centrifugar a 5,000 x g por 5 minutos, se recoge con cuidado el sobrenadante y se descarta el precipitado.
5. Agregar 500 σ l de fenol estabilizado, agitándose hasta la formación de la emulsión.
6. Centrifugar a 12,000 x g por 15 minutos. Se recoge la fase acuosa.
7. Agregar 500 σ l de Cloroformo- Alcohol isoamílico- fenol, agitándose suavemente.
8. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se recoge el sobrenadante.
9. Agregar 500 σ l de etil eter, agitándose suavemente.
10. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante.
11. Agregar 1/8 del volumen de acetato de sodio 4M.
12. Agregar 2 volúmenes de Alcohol etílico.
13. Dejar en reposo 12 a 16 hr a -20°C .
14. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se elimina el líquido suavemente, sin perturbar el precipitado.
15. Agregar 400 σ l de Alcohol etílico al 70%.
16. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos. Se descarta el líquido suavemente, sin perturbar el precipitado.
17. Secar el precipitado a 37°C .
18. Agregar 200 σ l de TE-RNAasa.
19. Conservar a -20°C .

5) Marcado de sonda

a) Digestión.

1. A la muestra se le agrega HindIII (10 a 20 unidades), se pasa por la cápsula y se incuba durante 3 horas a 37°C .

2. Se agregan 400 σ l de agua bidestilada y Agregar 400 σ l Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1).
3. Después de agitar suavemente, se centrifuga a 12,000 xg por 15 minutos.
4. Del tubo se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se le agregan 400 σ l de Cloformo-Alcohol Isoamílico.
5. Después de agitar suavemente, se centrifuga a 12,000 xg por 15 minutos.
6. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio. Se agregan 50 σ l de acetato de sodio 4 M y 1 ml de etanol preenfriado.
7. La muestra se conserva en congelación a -20 C por cuatro horas o a -80 por una hora.
8. Posteriormente se centrifuga a 13,000 xg por 20 minutos a 4 C.
9. Con cuidado de no perturbar el precipitado se descarta el sobrenadante y se agrega 0.5 ml de etanol al 70%.
10. Se centrifuga a 13,000 xg por 20 minutos a 4 C.
11. Con cuidado de no perturbar el precipitado se descarta el sobrenadante.
12. El precipitado se seca a 37 C.
13. Finalmente se agregan 40 σ l de TE.

b) Marcado con digoxigenina.

1. De la muestra se toman 16 σ l, pasándose a un tubo de centrifuga con tapa de broche o rosca.
2. El tubo con la alícuota se ebulle en baño María durante 10 minutos a 100 \forall C.
3. Inmediatamente después se coloca el tubo en hielo con sal.
4. Al tubo se le agregan 4 σ l de "DIG High prime". En una cápsula se centrifuga.
5. Incubese por 14 a 20 horas a 37 \forall C.
6. La reacción se detiene agregando 2 σ l de una solución de EDTA 0.2 M, ph 8

7. Para la precipitación del ADN se agregan 2.5 σ l de una solución de cloruro de litio 4M y se añaden 75 σ l de alcohol precongelado (a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
8. El ADN mit se precipita dejando el tubo en congelación (una hora a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o cuatro horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
9. El tubo se centrifuga a 13,000 xg por 15 minutos.
10. Con extremo cuidado se descarta el sobrenadante y se agregan 50 σ de alcohol preenfriado al 70%.
11. La muestra se seca a 37 C por 1 hora.
12. El precipitado se redisuelve en 50 σ l de amortiguador TE.

c) Cuantificación.

1. Se preparan las siguientes diluciones:

Dilución	submuestra	TE 0.1 M
A	1 σ l sonda marcada	39 σ l
1	10 σ l de la dilución A	23 σ l
2	5 σ l de la dilución A.	45 σ l
3	5 σ l de la dilución 1	45 σ l
4	5 σ l de la dilución 2.	45 σ l
5	5 σ l de la dilución 3.	45 σ l

2. A una tira de cuantificación se le agrega en diferentes áreas, 1 σ l de cada una de las dilución 1-5.
3. La tira se deja secar por 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Se preparan cinco viales con los siguientes reactivos.

Vial	Reactivo	Cantidad
1	Solución amortiguadora 2 (Blocking solution)	2 ml
2	Solución 2 con el anticuerpo (1:2,00)	2 ml
3	Amortiguador de ácido maléico	2 ml
4	Amortiguador TN	2 ml
5	Amortiguador TN + 40 μ l de solución NBT (protegiendolo de la luz).	2 ml

5. La tira una vez seca (del paso 3) se coloca junto con una tira control de cuantificación.

6. Las tiras se introducen con cuidado en los viales, con el siguiente orden y tiempos:

Vial	Tiempo (minutos)	Reacción
1	2	Bloqueo
2	3	Pegado de anticuerpo
1	1	Bloqueo
3	1	Lavado
4	1	Equilibrado
5	5 - 30	Reacción de color

Los resultados se determinan contrastando la tira de cuantificación con la control, en la que hay concentraciones conocidas de ADN marcado con digoxigenina.

6) Prueba de "Dot blot"

1. Del ADN se preparan diluciones a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} en agua destilada y estéril.
2. En una membrana colocar 1 μ l de cada dilución.
3. La membrana se deja secar a temperatura ambiente 15 minutos.

4. Posteriormente se coloca en el horno UV ("cross-linker") a 120,000 σ Joul / cm^2 (membranas de las marcas "Biorad" o "Boehringer") o en el horno a 80 ^\circ C por 30 minutos (membrana marca "Biodyne-B").
5. Introducir la membrana en una bolsa de hibridación y agregar 2.5 ml de solución de hibridación, por cada 100 cm^2 .
6. Sellar y prehibridizar por 3 a 4 horas a 68 ^\circ C.
7. Transferir la sonda (10 a 15 ng/ ml) en un tubo con tapa e introducirlo en un baño de agua hirviente por 10 minutos y posteriormente se enfria rápidamente en hielo por 10 minutos. Centrifugar en cápsula y agregar 2.5 ml de solución de hibridación por cada 100 cm^2 .
8. Eliminar el amortiguador de prehibridación y agregar la mezcla de hibridación más la sonda, obtenida del paso 7. Agregar solución de hibridación, para obtener un volumen de 2.5 ml por cada 100 cm^2 de membrana.
9. Sellar la bolsa de hibridación evitando las burbujas e hibridar durante 12 a 16 horas a 68 ^\circ C.
10. Sacar la membrana con mucho cuidado. La solución de hibridación con la sonda puede tener hasta 4-5 reusos, por lo que se recomienda guardarla en congelación (a -80 ^\circ) hasta su reutilización.
11. Se efectúan los siguientes lavados de la membrana:
 - a. En solución 2x SS, dos veces por 15 minutos a temperatura ambiente.
 - b. Solución 0.5 x SSC, dos veces por 15 minutos a 68 ^\circ C.
 - c. Solución de lavado por cinco minutos a temperatura ambiente.
 - d. Solución de bloqueo, una hora a temperatura ambiente.
 - e. Solución de bloqueo más solución antidig (1:5,000), una hora.
 - f. Solución de lavado por 15 minutos dos veces.
 - g. Amortiguador TN (pH 9.5), durante 5 minutos.

h. Mezcla de color (amortiguador TN- 2 ml- más NBT -40 σ l-), durante 30 minutos a 24 horas protegido de la luz y sin moverlo.

12. Se detiene la reacción enjuagando la membrana con agua destilada. La membrana se puede almacenar en una solución TE (si se reutiliza posteriormente), o secandola a 37 \forall C.

7) Hibridación

a) Digestión con las endonucleasas.

1. En un tubo con tapa se colocan 8 σ l de ADN total y se agrega 1 σ l del amortiguador de reacción específico y 1 σ l de la endonucleasa correspondiente.
2. Se deja incubando durante 4 horas a 37 \forall C (dependiendo de la endonucleasa).
3. La reacción se detiene con 2 σ l de azul de bromofenol.

b) Electroforesis.

1. Las muestras se colocan en el gel de agar (0.8 a 2 % dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados), para correr una electroforesis a 2 V / cm, dejandose avanzar la muestra hasta que el azul tenga un avance de 2/3 del gel.
2. Se detiene la electroforesis y se visualizan los productos con bromuro de etidium en transiluminador de UV.

c) Transferencia del gel a la membrana.

1. Se enjuaga el gel por 15 minutos en solución de ácido clorhídrico 0.25 N.
2. El gel se enjuaga dos veces con agua destilada, para eliminar el exceso de ácido clorhídrico.
3. Se agrega el amortiguador de desnaturalización (NaOH 0.5N), agitandose el gel 30 minutos.
4. Para la transferencia al vacío, 15 minutos antes de concluir el paso 8, se prepara la cámara de transferencia de vacío.

- a. Se corta la membrana de naylon (0.5 cm más grande que el tamaño del gel) y se introduce en agua destilada en un ángulo de 45°.
 - b. Se corta papel filtro wathman (3 (1 centímetro más grande que el gel).
 - c. La membrana y el papel filtro se humedecen en una solución 10x SSC.
 - d. Se coloca el papel filtro en el centro del plato de la cámara de vacío. Para evitar burbujas se pasa rodando una pipeta estéril sobre el papel filtro.
 - e. Se humedece el “O” ring de la cámara de vacío.
 - f. Sobre el papel filtro se coloca la membrana, rodando la pipeta sobre la membrana.
 - g. La ventana plástica se coloca sobre el papel filtro y la membrana.
 - h. Los pozos del gel se cubren con agarosa, evitando la formación de burbujas.
 - i. Se coloca el gel sobre la ventana plástica, evitando burbujas.
 - j. Se coloca el marco.
 - k. Precalentar la bomba 10 minutos (se sugiere encenderla en el paso a) y ajustar a 5 in/Hg.
 - l. Se coloca 1.5 lt de solución 10x SSC.
10. Se transfiere al vacío durante 90 minutos.
11. Posteriormente se remueve la membrana, cortando una de las esquinas para ubicar la posición de las muestras.
12. La membrana se lava durante 5 minutos en una solución 2x SSC.
13. La membrana se seca entre hojas de papel filtro y se fija el ADN con el horno de UV (“cross-linker” a 120,000 σ Joul / cm²) o en calor (horno a 80°C por 30
14. La membrana se puede almacenar en bolsas de plástico entre las hojas de papel filtro, o se continua con la hibridación.

d) Hibridación.

1. Se prehibridiza, en frascos de hibridación, por 2-4 horas con 20 ml de solución de hibridación, por cada 100 cm².
2. Transfiera la sonda (10 a 15 ng/ ml) en un tubo con tapa y agregar 12.5 μ l de ADN de esperma de arenque. Introduzca el tubo en un baño de agua hirviendo por 10 minutos y posteriormente enfriar rápidamente en hielo por 10 minutos. Centrifugar en cápsula y agregar 2.5 ml de solución de hibridación por cada 100 cm².
3. Eliminar el amortiguador de prehibridación y agregar la mezcla de hibridación más la sonda, obtenida del paso 7. Agregar solución de hibridación, para obtener un volumen de 2.5 ml por cada 100 cm² de membrana.
4. Se hibridiza durante 12 a 16 horas a 68 $^{\circ}$ C.
5. Se retira la solución de hibridación y se guarda.

e) Revelado.

1. Se efectúan los siguientes lavados a la membrana:
 - a. En solución 2x SSC, 0.1 % SDS, dos veces por 5 minutos a temperatura ambiente.
 - b. Solución 0.1 x SSC, 0.1 % SDS, dos veces por 15 minutos a 68 $^{\circ}$ C.
 - c. Solución de lavado por cinco minutos a temperatura ambiente.
 - d. Solución de bloqueo, 30 minutos a temperatura ambiente.
 - e. Solución de bloqueo más solución antidig (1:5,000), 30 minutos.
 - f. Solución de lavado por 15 minutos dos veces.
 - g. Amortiguador TN (pH 9.5), durante 5 minutos.
 - h. Se prepara la bolsa de hibridación con la membrana y se agrega la mezcla de color fresca(amortiguador TN- 2 ml- más NBT -40 μ l-), durante 30 minutos a 24 horas protegido de la luz y sin moverlo.

- i. Se detiene la reacción enjuagando con el amortiguador 4. La membrana se puede almacenar en una solución TE (si se reutiliza posteriormente), o secándola a 37°C.

Preparación de reactivos.

En la preparación de todos los reactivos se recomienda agua destilada y esterilizada.

TEK, pH 7.5.

50 mM tris
10 mM EDTA
1.5% KCl

TEK-Igepal

9 ml TEK
1 ml Igepal

Sacarosa-TEK (15%)

100 ml TEK
15 gr. Sacarosa

TAE (solución 50X), pH 8.5

2 M Tris
1M Acido acético
0.5 M EDTA. Na₂

Azul de bromofenol.

7 M Urea
0.01 M EDTA
5 gr.Sacarosa
0.01 gr Azul de bromofenol
Aforar a 10 ml.

Bromuro de etidium

50 μ l Bromuro de etidium (10 mg/ ml)
50 ml Agua

Agar 0.8%

30 ml TAE 1x
0.18Agar

TE, pH 8.0

10 mM Tris
1 mM EDTA

SDS al 20 %

100 gr. SDS

375 ml Agua
Ajustar el pH a 7.2 con HCl y aforar a 500 ml.

Proteinasa K

100 mg Proteinasa K
5 ml Agua
Guardar en alicuotas a -20°C

Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico

25 partes Fenol equilibrado
24 partes Cloroformo
1 parte Alcohol isoamílico

Cloroformo-Alcohol isoamílico

24 partes Cloroformo
1 parte Alcohol isoamílico

Fenol equilibrado.

1. Se funde el fenol a 60 °C y se agrega 0.1% de hidroxiquinolina.
2. Se agrega un volumen de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y se agita por 15 minutos.
3. Se descarta la fase superior acuosa.
4. Se agrega un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 y se agita por 15 minutos.
5. Se descarta la fase superior acuosa.
6. Se repite el paso d y e hasta llevar el fenol a pH 8.0, medido con papel pH.
7. Se agrega 0.1 volumen de tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, con 0.2 % de Beta-mercaptoetanol.
8. Se almacena en alicuotas a -20°C.

TE-RNasa (10 ml)

1 ml Acetato de Sodio 1M, pH 4.8
0.6 ml EDTA 50 mM, pH 4.8
100 mg RNasa A

Se divide en alicuotas de 200 µl en tubos con tapadera.

Los tubos se colocan en baño de agua hirviendo durante 10 minutos.

Se conserva a -20°C.

Para la RNasa de uso se agrega TE 0.1X, para obtener una concentración final de 200 µg/ml. Por ejemplo a 10 µl de RNasa se le agregan 490 µl de TE 0.1X.

Amortiguador 1. Amortiguador de ácido maléico.

0.1 M Acido maléico
0.15 M NaCl
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH

Amortiguador 2.

1 ml "Blocking solution 10 x" (del paquete comercial de marcado) 10x
9 ml Amortiguador

Amortiguador 3. Amortiguador TN.

0.1 M Tris-HCl
0.1 M NaCl
50 mM MgCl₂
Ajustar el pH a 9.5.

Amortiguador estandar de hibridación.

5x SSC
0.1% (w/v) N-laurylsarcosina.
0.02% (w/v) SDS
1/10 volumen de "Blocking solution 10x"

Amortiguador de lavado.

Amortiguador de ácido maléico
0.3% Tween 20 (v/v)

Amortiguador 4

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
Ajustar el pH a 8.0

Amortiguador de desnaturalización.

0.5 N NaOH

SSC x20

350.64 gr. NaCl
176.46 gr. Citrato de sodio
Aforar a 2 litros. En agua caliente primero se disuelve el citrato de sodio.

ANEXO 5.

Datos biométricos de los fundúlidos peninsulares.

Caracteres merísticos y morfométricos medidos. Simbología: LT= Longitud total; LP= Longitud patrón; LC= Longitud cefálica; BO= tamaño de la boca; DP= Distancia preorbital; OJ= Diámetro ocular; PO= Dist. postocular; PD= Dist. predorsal; AD= ancho de la dorsal; DD= Dist. postdorsal; DC= Dist. postanal; AM= Altura máxima; RD= Radios de la dorsal; RC= Radios de la caudal; RA= Radios de la anal; ES= Escamas.

ANEXO 6

Anexo 1. Datos alozimáticos. Simbología: 0= Longitud total en cm, 1= MpiI, 2= G6pd, 3= Me-2, 3= Me-1, 4= Ldh1, 5= Idh1, 6= Pgm1, 7= Gadp, 8= Pt-3, 9= Pt-2, 10= Aat1, 11= Aat2, 12= Est2, 13= PepB, 14= Mdh1, 15= Mdh2.

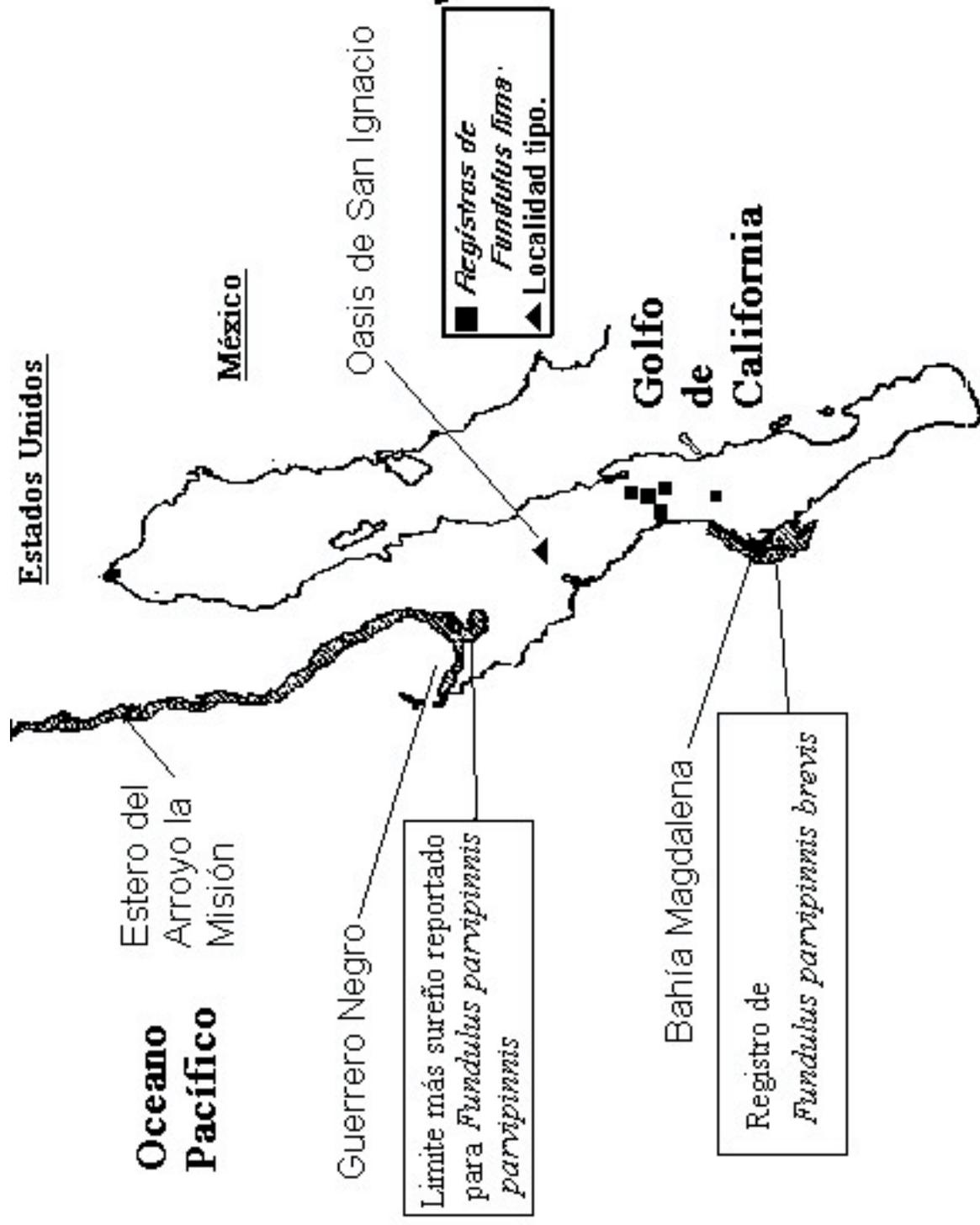


Figura 1. Distribución de los fundulidos en la Península de Baja California.

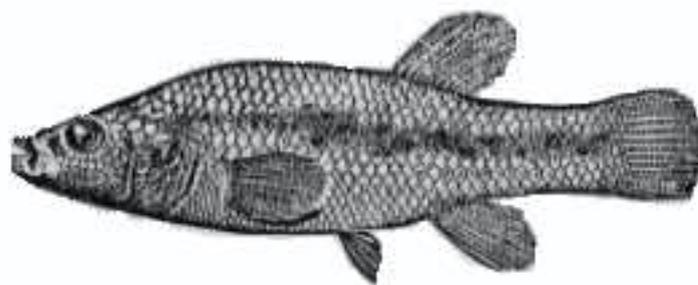


Figura 2. *Fundulus lima* Vaillant, 1894 (Tomado de Evermann, 1908).

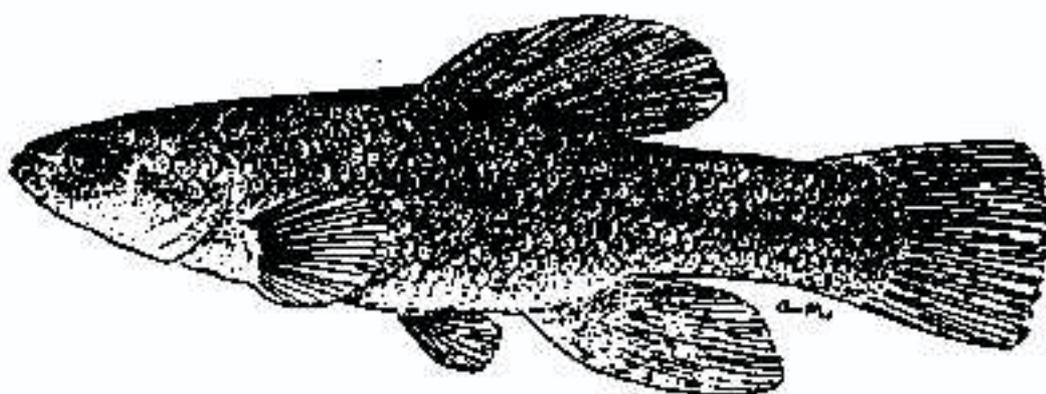


Figura 3. *Fundulus parvipinnis parvipinnis* Girard, 1854 (tomado de Moyle, 1976)

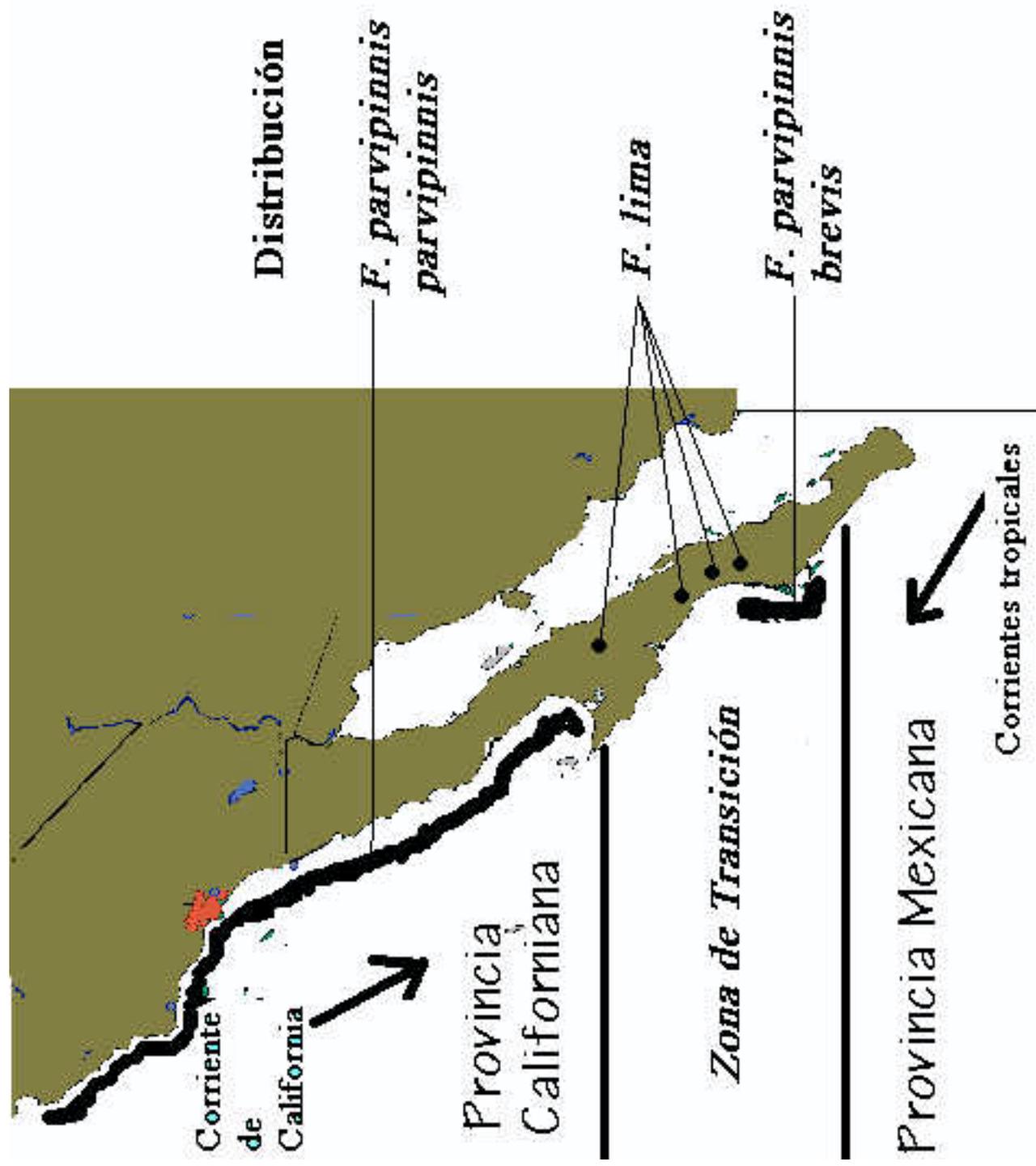


Figura 3. Provincias biogeográficas de la península de Baja California, México (con base en Briggs, 1974) y la distribución de los fundúlidos peninsulares.

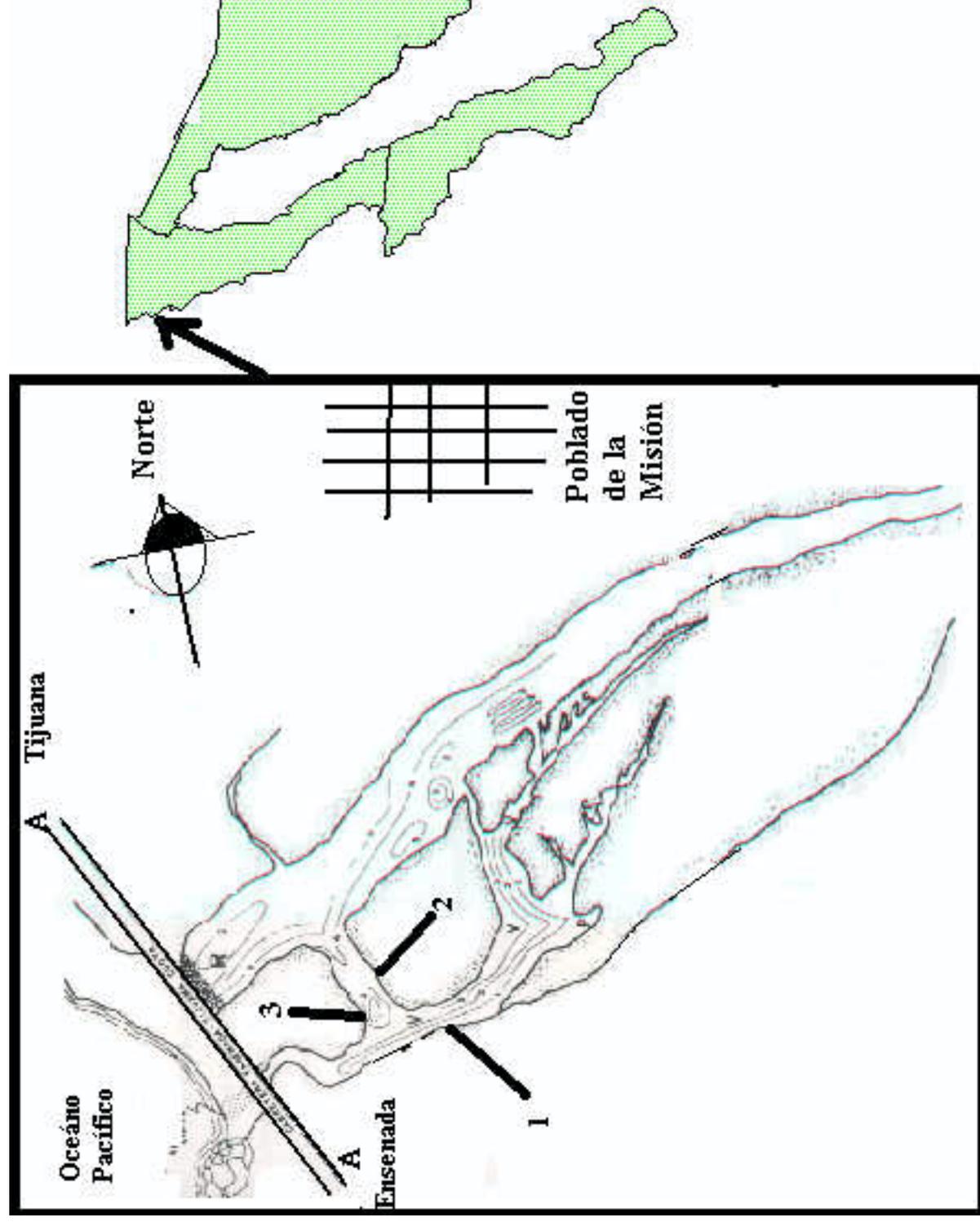


Figura 5. Localidades de recolecta de *Fundulus parvipinnis parvipinnis* en la boca del Arroyo de la Misión (B.C.). Simbología: 1, 2 y 3: sitios donde se efectuaron los lances de chinchorro.

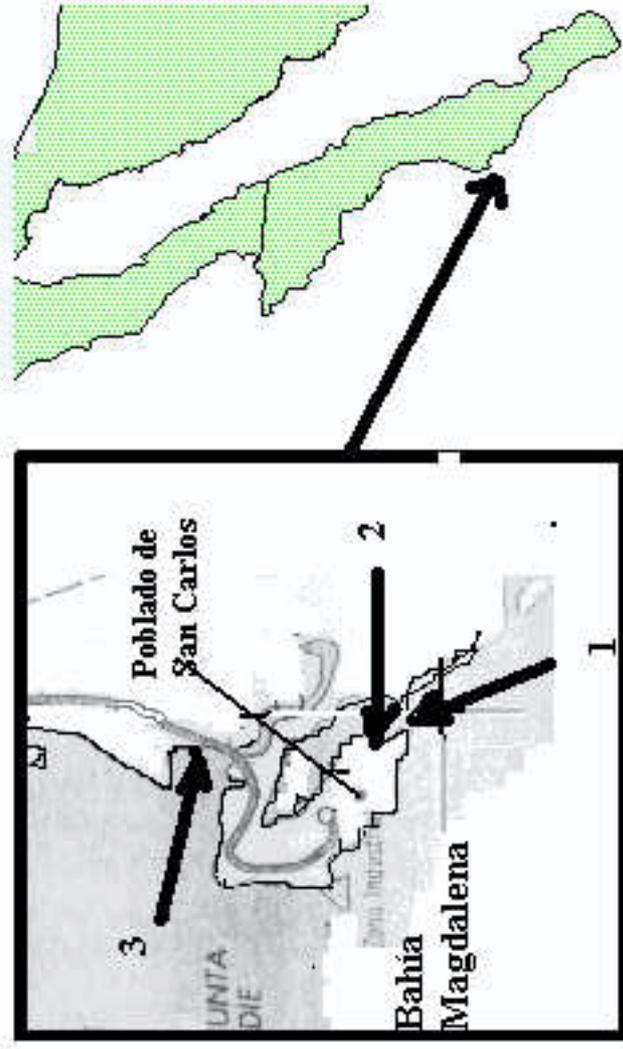


Figura 6. Sitios de recolecta de *Fundulus parvipinnis brevis*, en Bahía Magdalena (B.C.S.). Simbología: 1, 2 y 3: sitios donde se efectuaron los lances con chinchorro 1, 2 y 3.

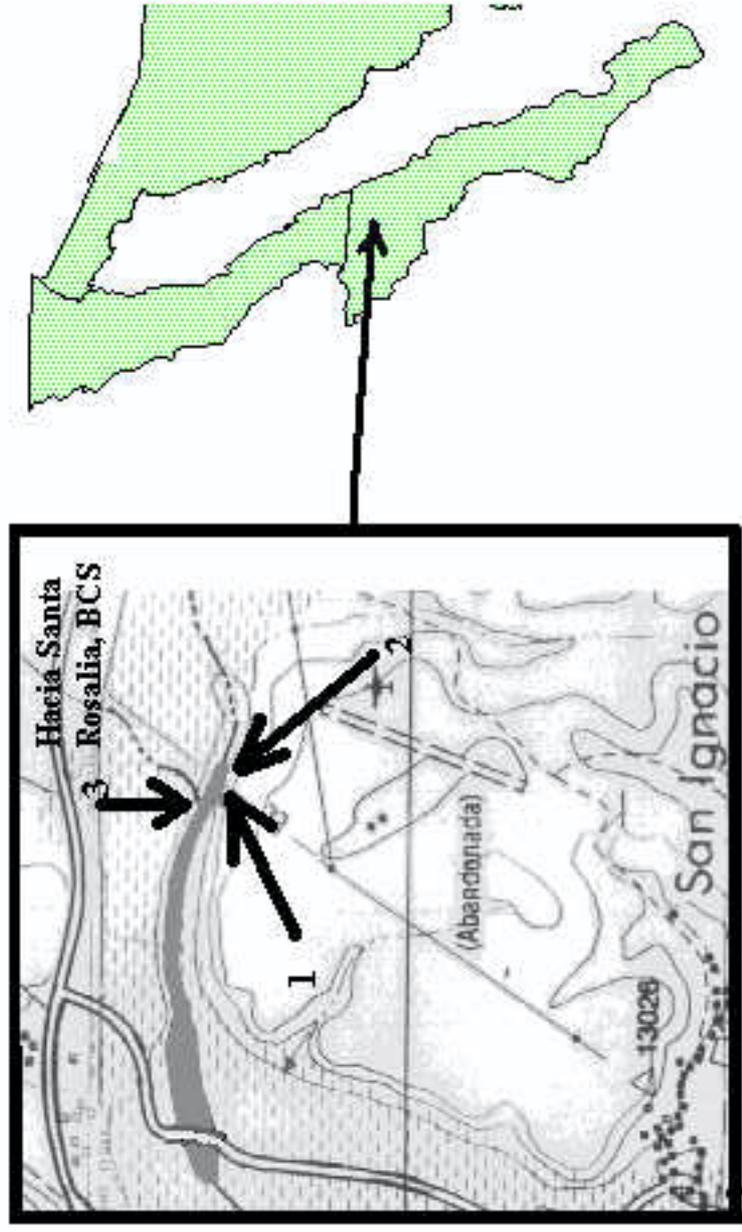


Figura 7. Mapa del Oasis de San Ignacio (B.C.S.), mostrando los sitios en donde se recolectó *Furciferus lunus* en el lance de chunchorro 1, 2 y 3.

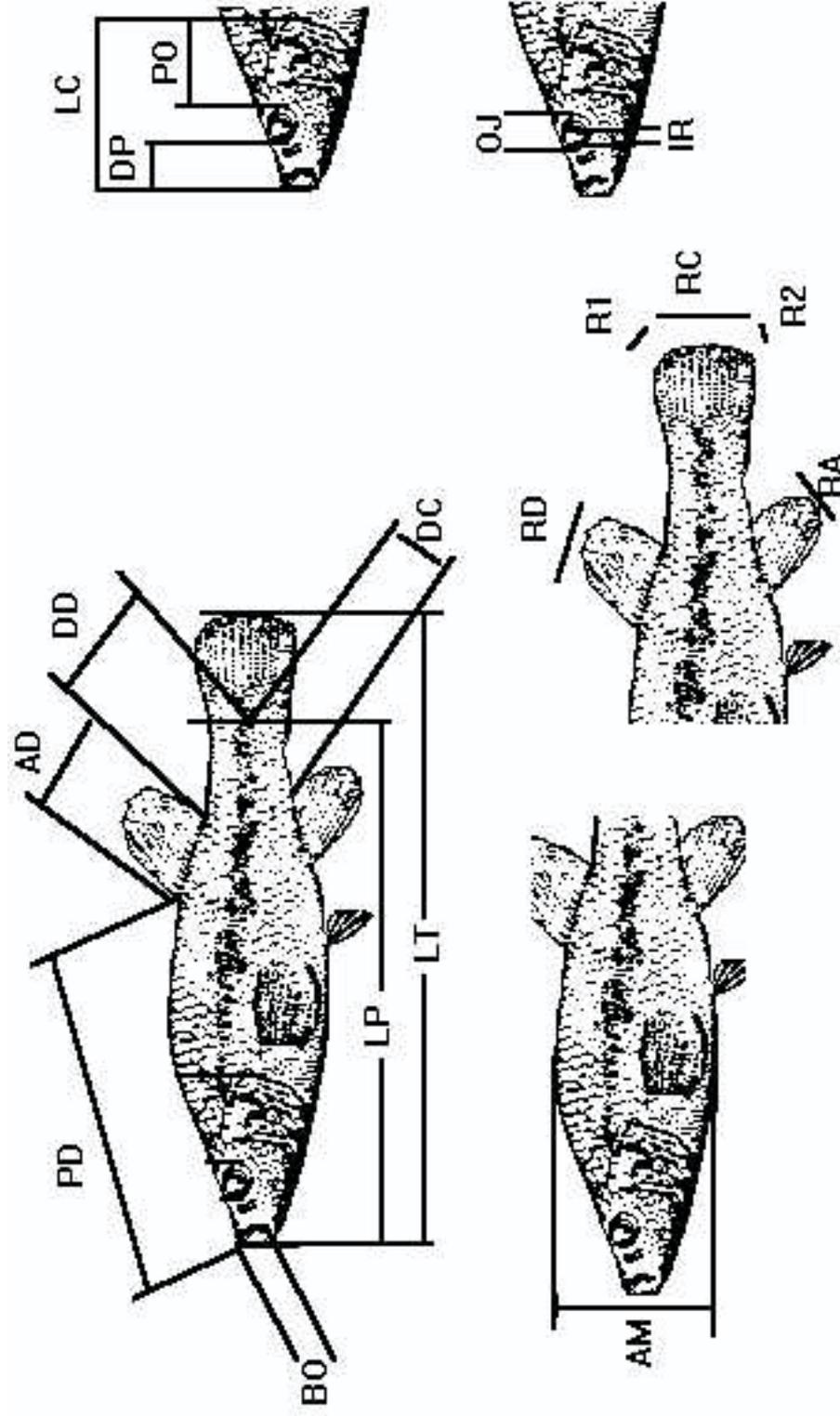


Figura 8. Caracteres morfológicos y morfológicos medidos. Simbología: LT= Longitud total; LP= Longitud patrón; LC= Longitud cefálica; BO= tamaño de la boca; DP= Distancia preorbital; OJ= Diámetro orbital; PO= Dist. postocular; PD= Dist. predorsal; AD= ancho de la dorsal; DD= Dist. postdorsal; DC= Dist. postanal; AM= Altura máxima; RD= Radios de la dorsal; RC= Radios de la caudal; RA= Radios de la anal; ES= Escamas en serie lateral o longitudinal.

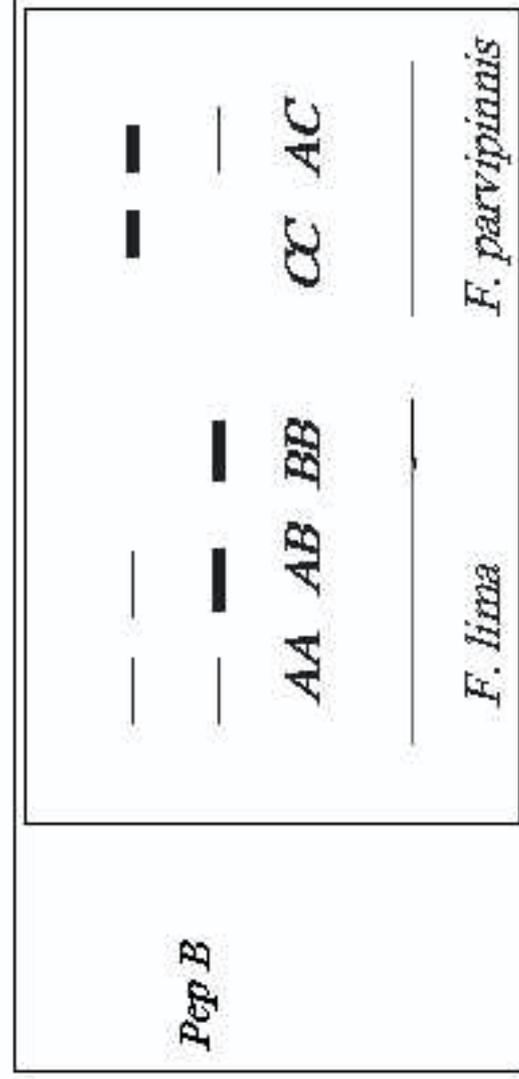


Figura 9. Designación de los alelos en Peptidasa B, por la intensidad en las bandas de los zimógrafos.

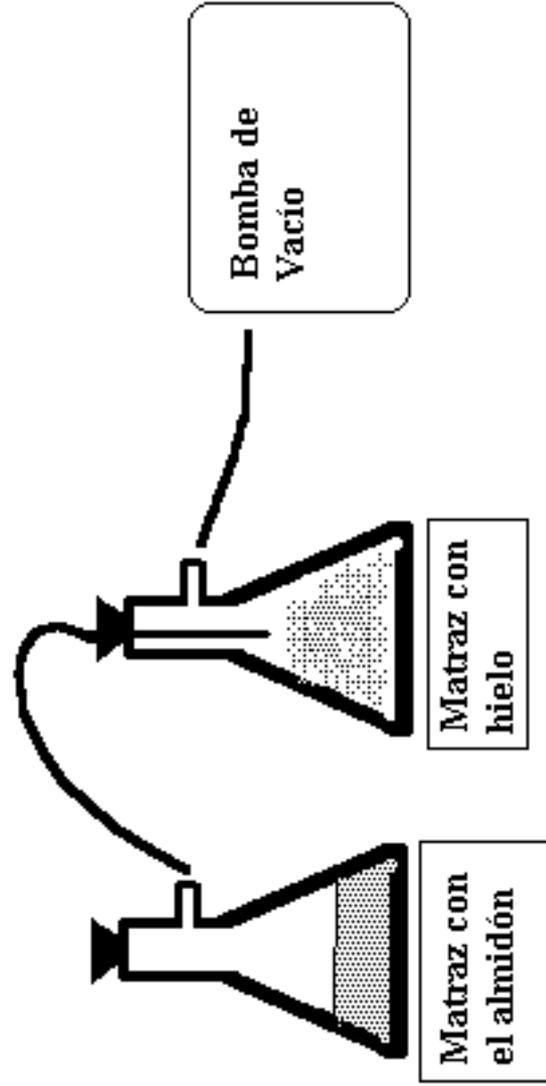
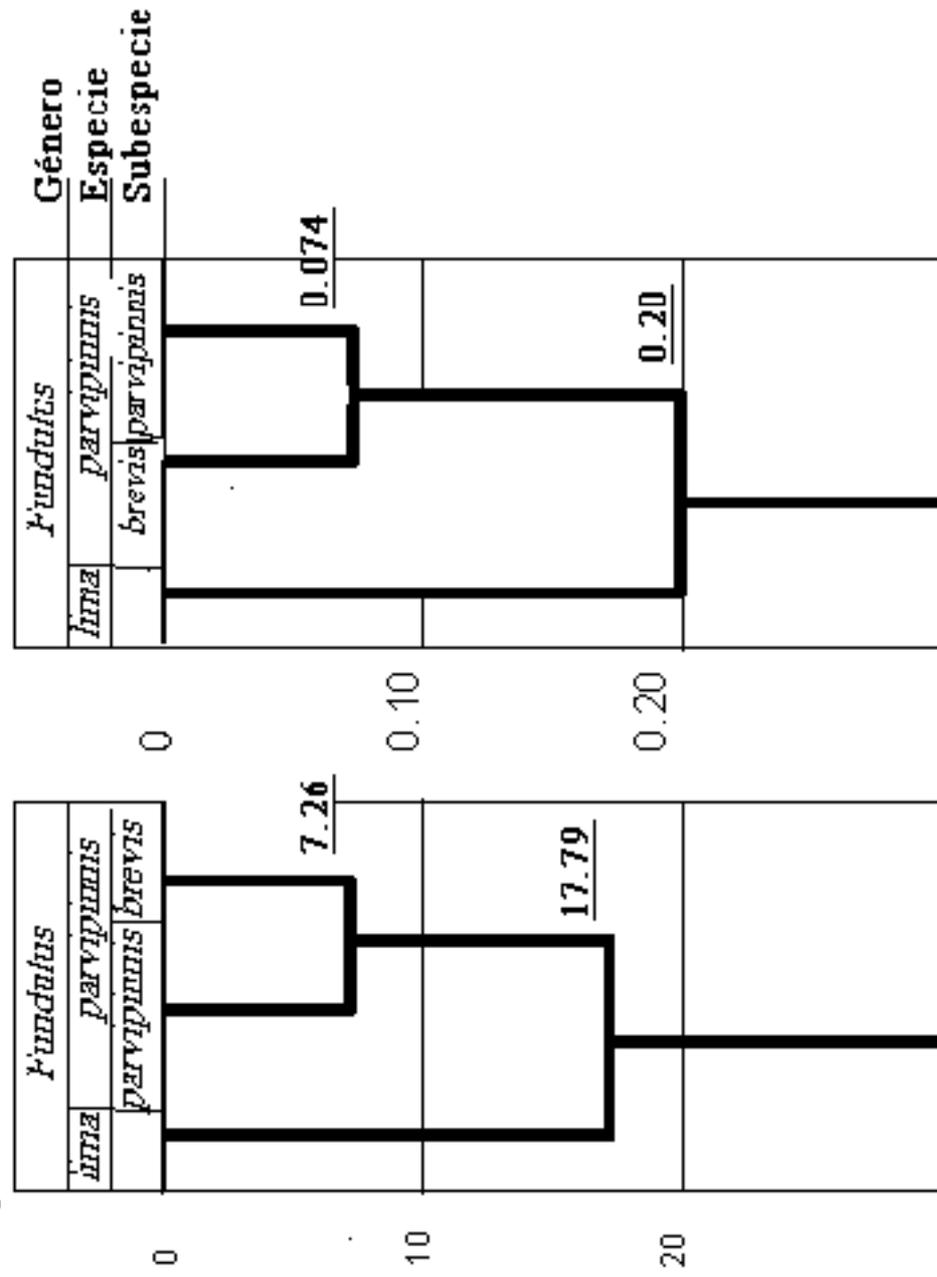


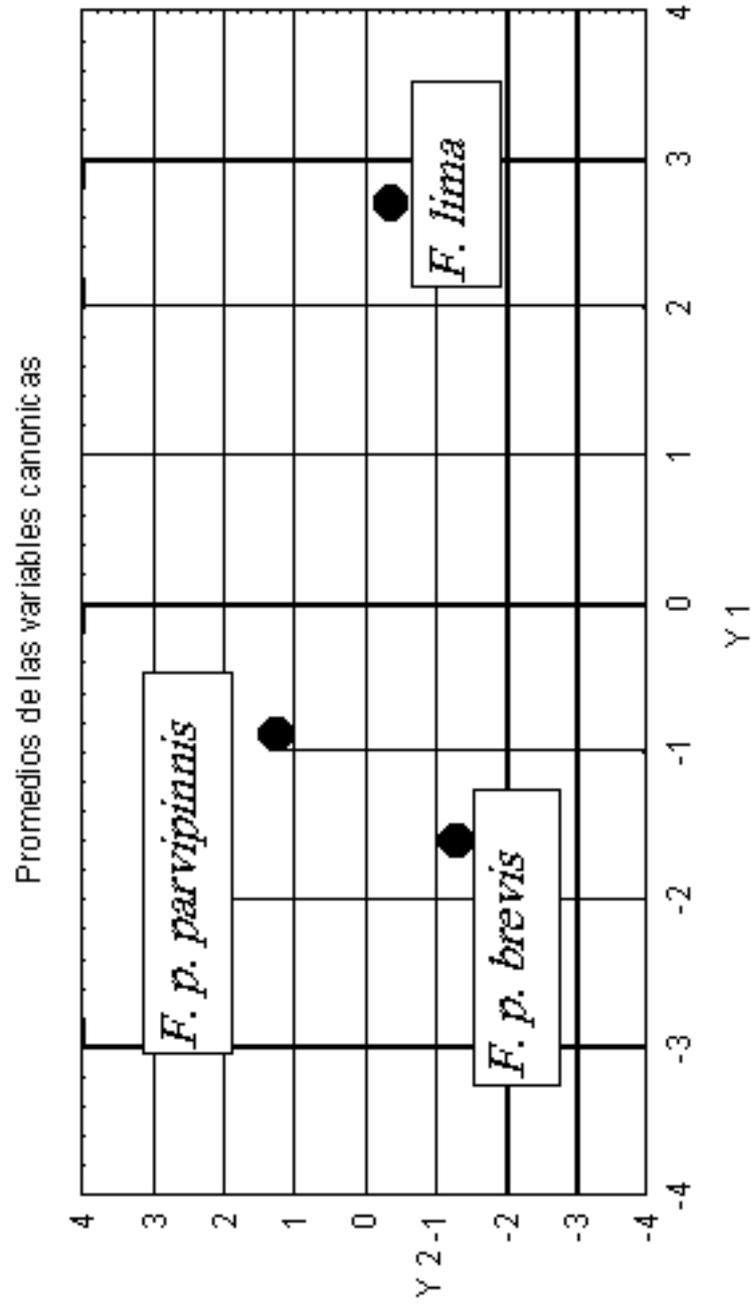
Figura 3 a. Esquema de la trampa de vacío para la preparación del gel de almidón, para las electroforesis de proteínas.

Distancia de Mahalanobis

Distancia Genética

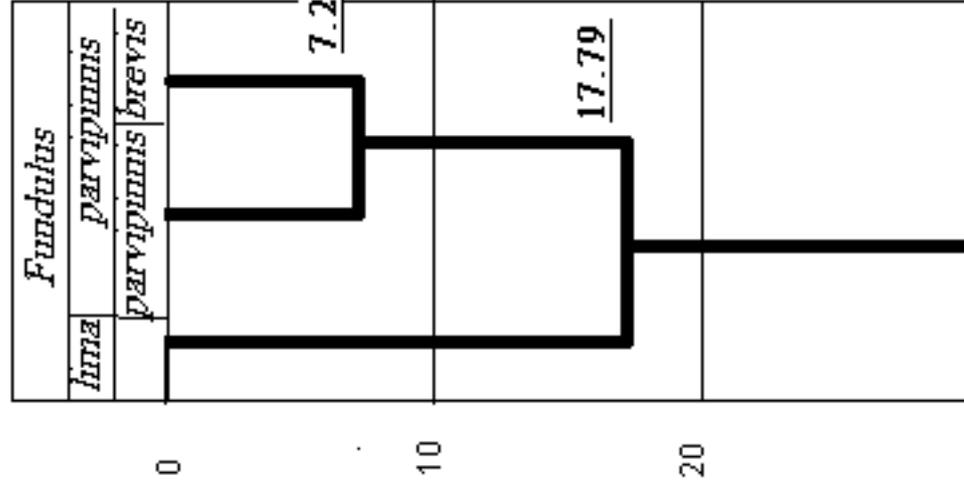


Gráfica 2. Dendrogramas de las distancias biométricas y genéticas entre los fundúlidos de la Península de Baja California. Distancia de Mahalanobis obtenidas de los datos biométricos y distancias genéticas de Nei (1978).

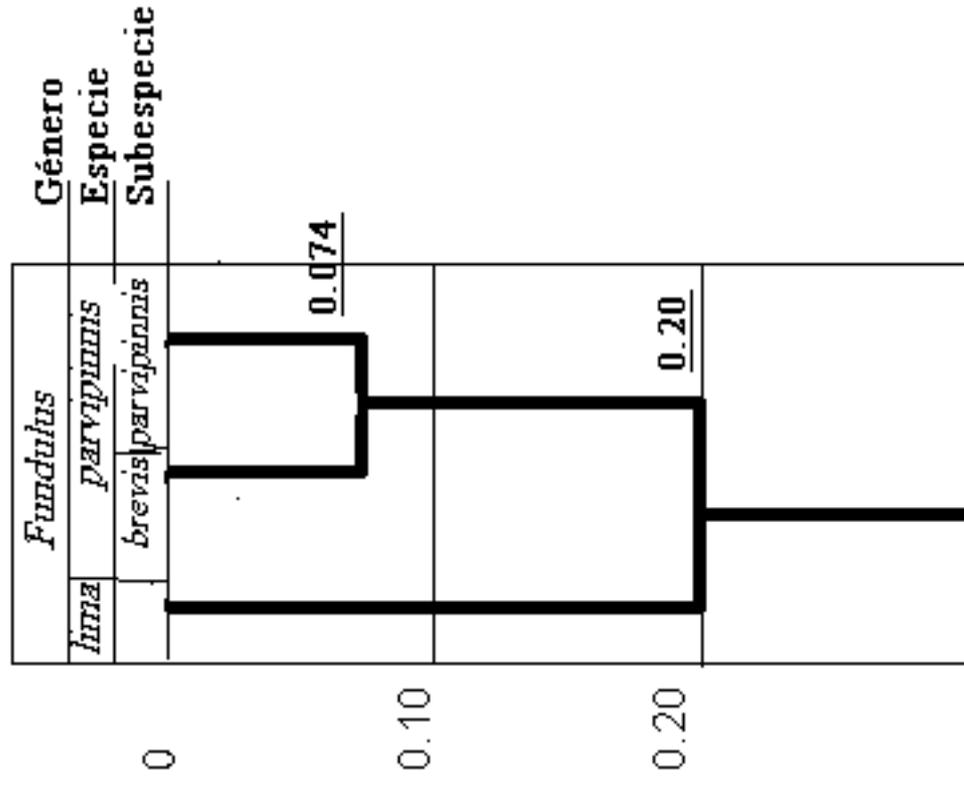


Gráfica 1. Gráfica del promedio de las variables canónicas resultantes del análisis de función discriminante.

Distancia de Mahalanobis



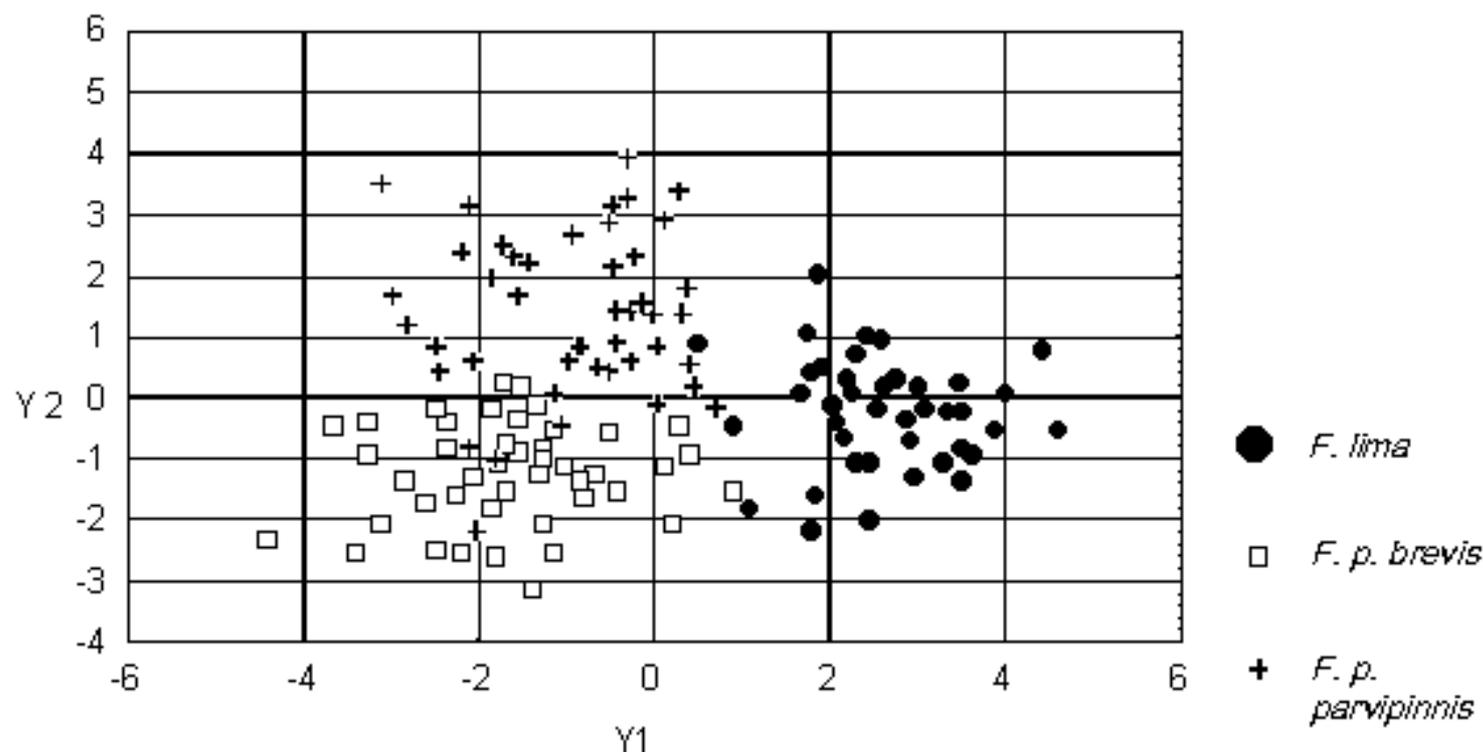
Distancia Genética



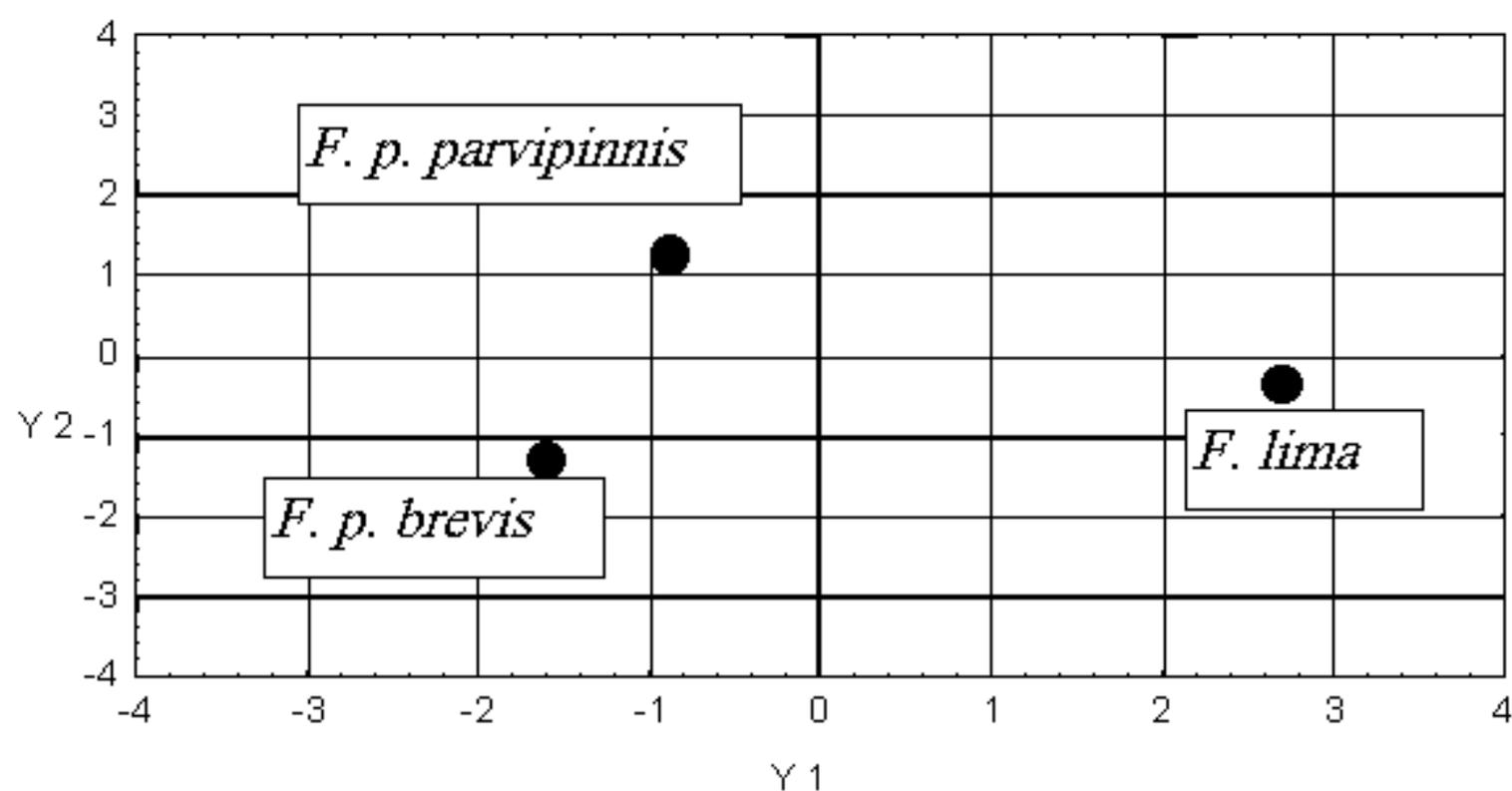
Gráfica 4. Dendrogramas de las distancias biométricas y genéticas entre los fundúlidos de la Península de Baja California. Distancia de Mahalanobis obtenidas de los datos biométricos y distancias genéticas de Nei (1978).

3a

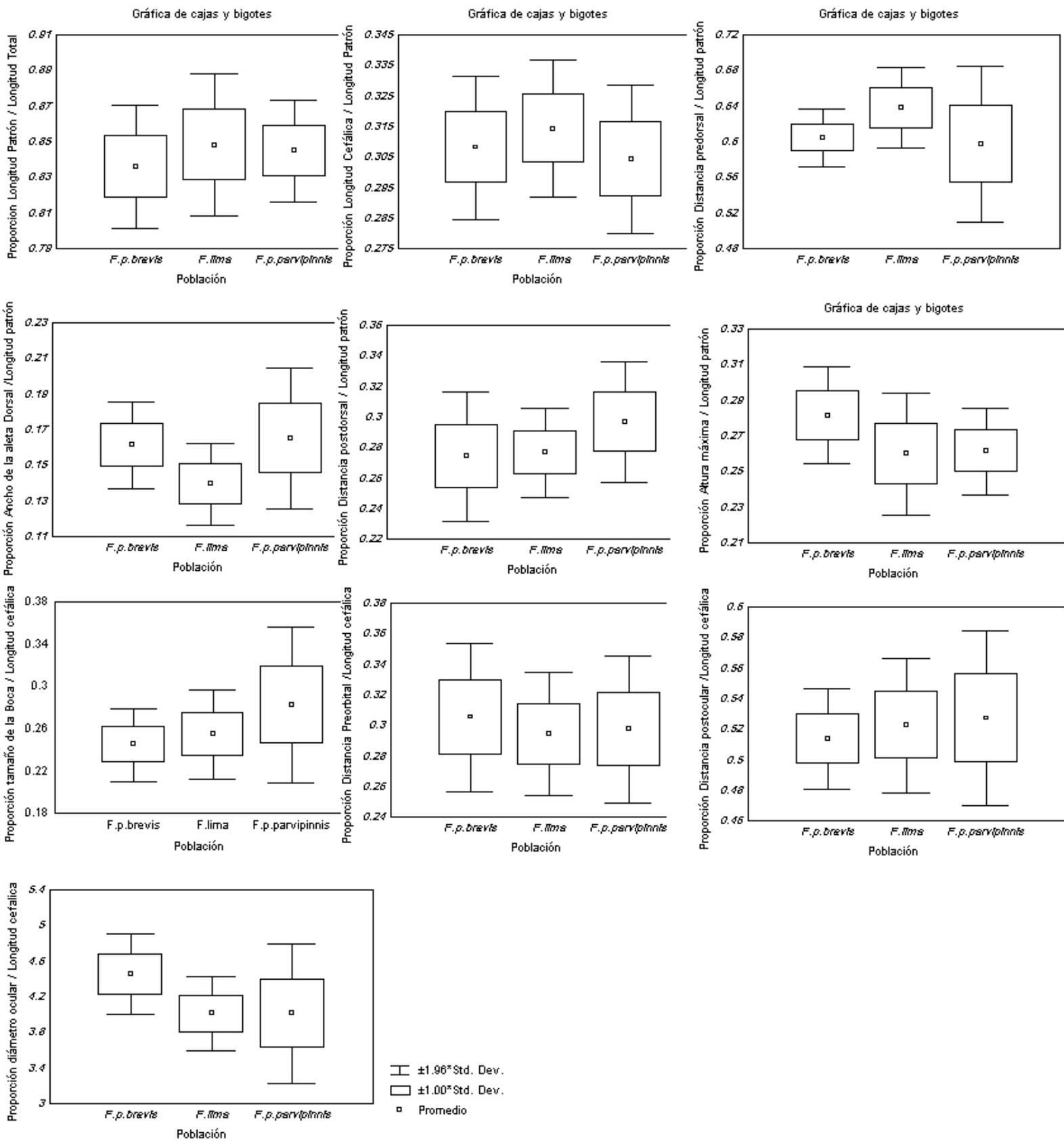
Raíz 1 contra Raíz 2

**3b**

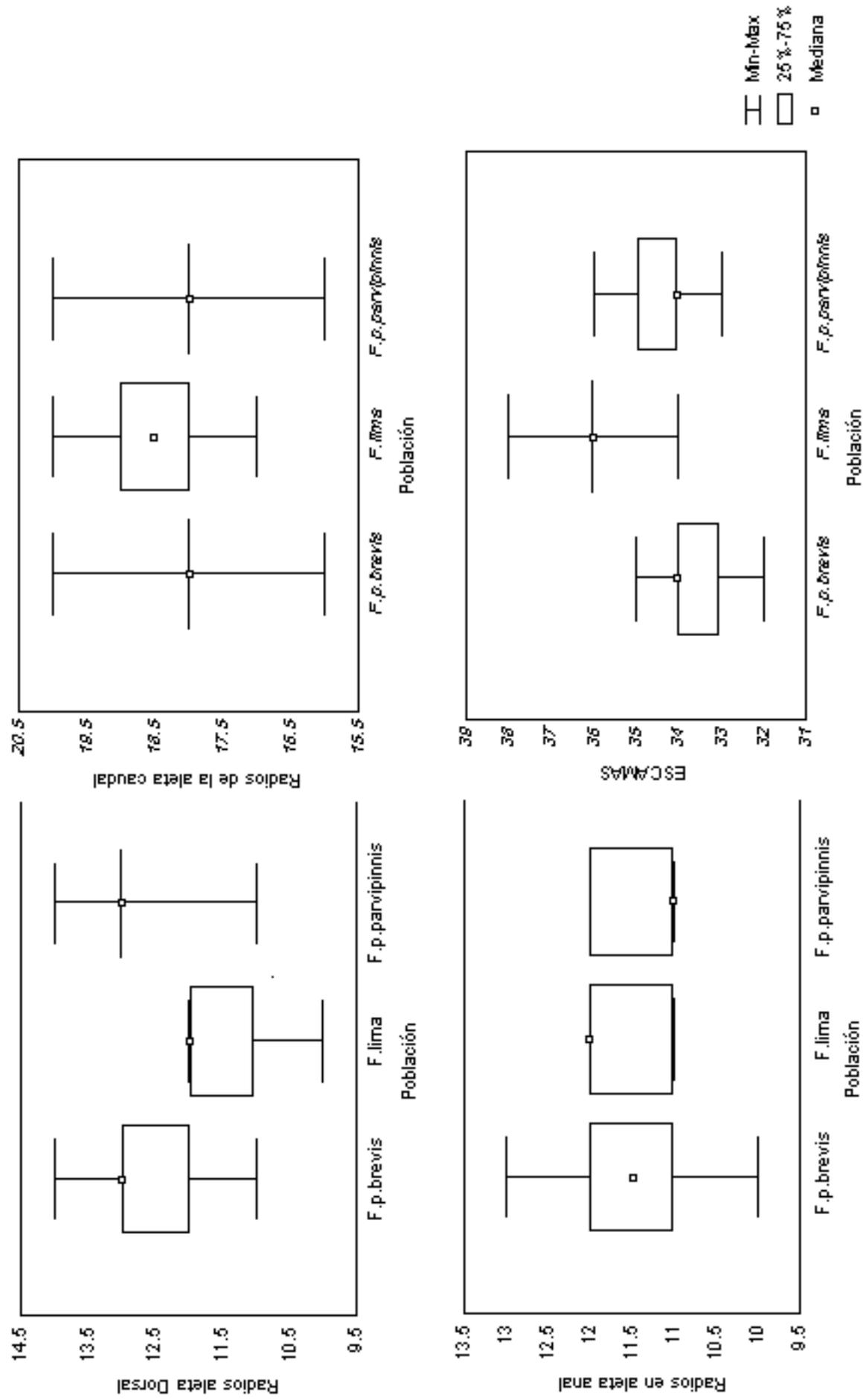
Promedios de las variables canonicas



Gráfica 3. Gráfica del análisis de función discriminante de la raíz 1 contra la raíz 2, de los fundúlidos peninsulares. 10 a: Con todos los datos y 10 b: Promedio de las variables canónicas.



Gráfica 2. Gráficas de cajas y bigotes de las proporciones morfométricas de los fundúlidos de la península de Baja California.



Gráfica 1. Gráficas de los caracteres morfológicos de los fundulidos peninsulares.

Estructura Cuaternaria	UN LOCUS		
	Monomera		
Dimera		  	
Tretamera		    	
Designación	AA	AB	BB

Figura 3d. Posibles patrones de bandeo para un locus.

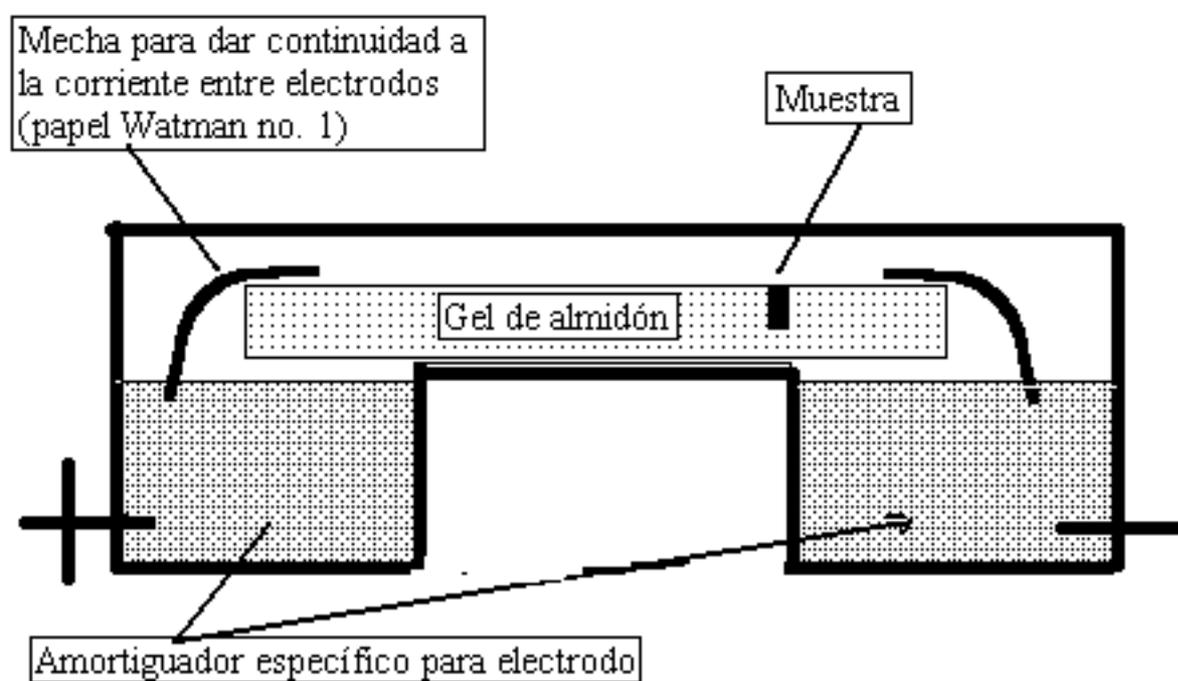


Figura 3c. Esquema del sistema de electroforesis empleado.

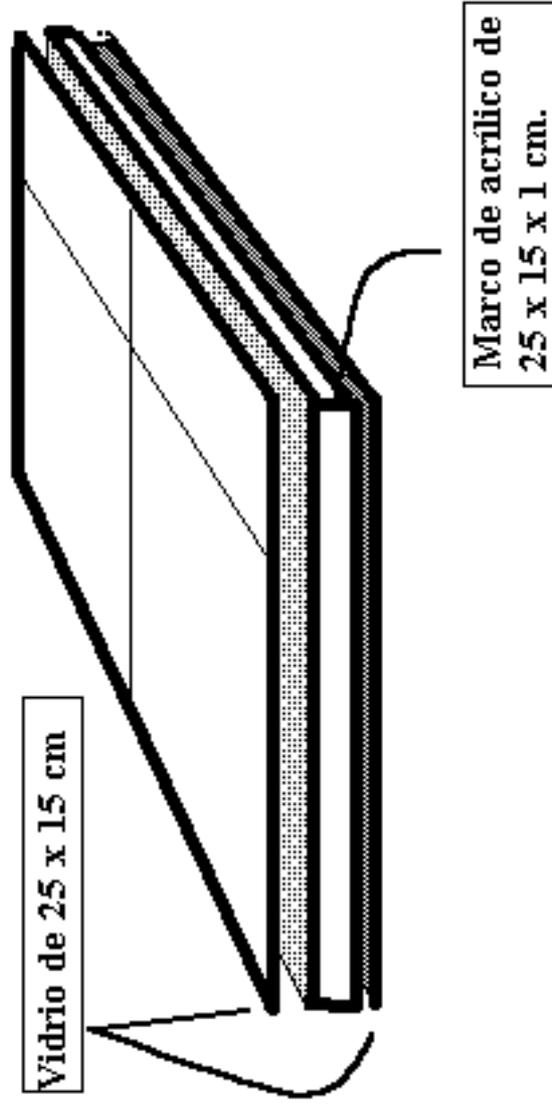
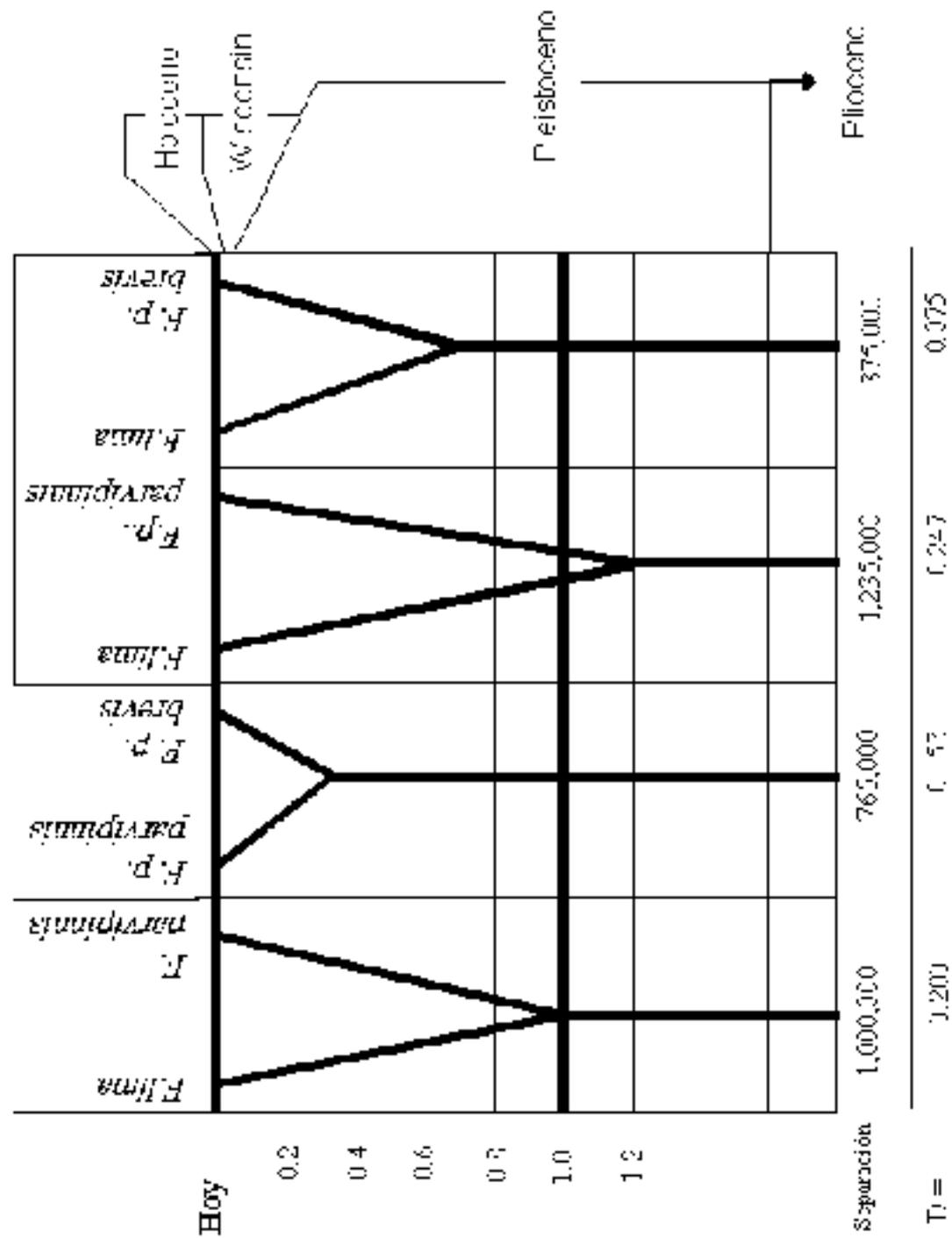


Figura 3 b. Esquema del sistema para el vaciado del gel de almidón, para las cámaras de electroforesis.



Gráfica 3. Estimación del tiempo de divergencia de los fundúlidos de la península de Baja California, basado en valores generales con la distancia genética de Nei (1987).