

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

CBS

**VARIABILIDAD MORFOMÉTRICA, MERÍSTICA Y MOLECULAR DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Chirostoma* (PISCES: ATHERINOPSIDAE)**



**COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

Barriga Sosa Irene de los Angeles

Dir. de Tesis: Dr. José Luis Arredondo Figueroa

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

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

El alumno recibió la Beca CONACYT-94151 durante el periodo 1995-1998.

Este trabajo fue apoyado por el convenio UAM-I CONABIO H017 con el proyecto “Sistemática molecular y poblacional de siete especies del género *Chirostoma*” durante el periodo 1996-1998.

Además del proyecto divisional de la UAM-I: “Sistemática molecular y poblacional de siete especies del género *Chirostoma*” durante el bienio 1996-1998.

Del presente trabajo derivaron tres Servicios Sociales:

- 1) Mora-Souza, Perla Ivett (1998). Estudio merístico, morfométrico y molecular de 8 especies del género *Chirostoma* Informe Final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 52.
- 2) Torres-Frías E. (1998). Análisis merístico, morfométrico y molecular de 7 especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Informe Final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 51.
- 3) Jiménez-Silva, Verónica (2001). Análisis del gene mitocondrial citocromo b en especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae) de los Lagos de Pátzcuaro, Michoacán y Chapala, Jalisco. Informe Final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 55.

EL JURADO DESIGNADO POR LAS
DIVISIONES DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DE LAS UNIDADES IZTAPALAPA Y XOCHIMILCO APROBÓ LA TESIS QUE
PRESENTÓ

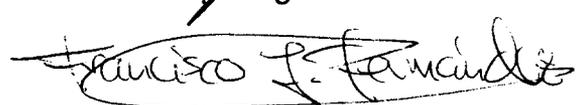
Barriga Sosa Irene de los Angeles

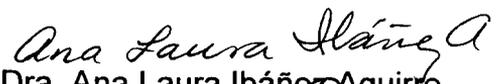
El día 27 de julio del año de 2001.

Comité Tutorial:

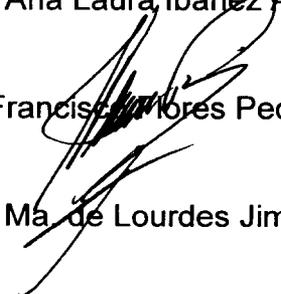

Tutor: Dr. José Luis Arredondo Figueroa


Asesor: Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns


Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino


Sinodal: Dra. Ana Laura Ibáñez Aguirre


Sinodal: Dr. Francisco Flores Pedroche


Sinodal: Dra. Ma. de Lourdes Jiménez Badillo

**A MIS PADRES: GILBERTO SEBASTIAN BARRIGA RUIZ †
Y
MA. DE LA LUZ SOSA LÓPEZ
POR DARME LA VIDA Y TODO SU AMOR
Y POR ENSEÑARME EL CAMINO.....**

**A MIS HERMANOS: GILBERTO ARMANDO BARRIGA SOSA
MA. DE LA LUZ VICTORIA BARRIGA SOSA
JORGE ALEJANDRO BARRIGA SOSA
CARLOS ALBERTO BARRIGA SOSA
POR ESTAR ALLI SIEMPRE.....**

**A MIS SOBRINOS CARLA Y SEBASTIAN BARRIGA CRUZ; VALERIA, CAROLINA
Y LUCHITA VILLANUEVA BARRIGA; JAHIR Y LENIN BARRIGA RUIZ; CLAUDIO
Y ¿???? BARRIGA VARGAS, POR LOS MUCHOS MOMENTOS DE ALEGRIA
QUE ME HAN DADO (INCLUYÉNDOTE A TI CUÑIS).**

**A MI ESPOSO DAGO, MI AGRADECIMIENTO POR TU APOYO, COMPRENSION
Y CARIÑO DURANTE EL LARGO TIEMPO QUE ME LLEVO ESTE PROYECTO.**

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. José Luis Arredondo Figueroa, por sugerir y permitirme desarrollar este tema de tesis, por su confianza y constante apoyo.

A mis asesores;

Dr. Diego González Halphen, por permanecer del inicio a casi el fin de este proyecto y por su apoyo.

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, por su atinada participación en el proyecto y por tener siempre una atinada crítica al trabajo. Gracias.

Dr. Francisco J. Fernández Perrino, por su corta pero muy atinada participación en el trabajo. Ciertamente sus minuciosas observaciones al primer manuscrito permitieron mejorar esta tesis.

A mis sinodales:

Dra. Ana Laura Ibañez, Dr. Francisco Flores Pedroche y Dra. Ma. De Lourdes Jiménez Badillo, por sus observaciones y comentarios para mejorar esta tesis en un corto tiempo, por su apoyo y solidaridad.

A los compañeros miembros del CRIP, Pátzcuaro, en especial a Claudio Osuna y Sergio Sabanero, por su apoyo en la colecta de los organismos procedentes de ese Lago, así como de los Lagos de Cuitzeo y Zirahuén. Al compañero F. Villaseñor del Centro Acuícola de Tizapán, Jalisco, por donar ejemplares de peces blancos.

A todos y cada uno de los compañeros de la PExPA, por su apoyo, crítica y compañerismo. En especial a Ivett Mora Souza y Eduardo Torres Frías, por su gran apoyo en la creación de la base de datos morfométricos y merísticos. A Claudia Silva por su entusiasta apoyo en el laboratorio con las alozimas.

El Dr. Ramos Curi de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana apoyo con las primeras secuencias del gen cit B.

A mis amigos de siempre.....

RESUMEN.

Los miembros del género *Chirostoma* son de gran importancia ictiológica, económica y cultural en México. Son especies endémicas de la Mesa Central que se encuentran en su gran mayoría amenazadas y sometidas a manejos indiscriminados. Los estudios a nivel nacional de estas especies son diversos, pero no existen estudios en los que se integren aspectos básicos de la identificación morfológica de las especies con datos genéticos en los que se relacionen los cambios de la carga genética de los diversos miembros del género a través del tiempo o que se refieran a la evolución molecular en los mismos. En la presente tesis se presentan y discuten los resultados generados con los análisis de caracteres morfométricos y merísticos (univariado y multivariado) y con caracteres genéticos alozimáticos de 13 especies y tres subespecies del género. Además se discuten resultados preliminares de la secuencia de dos genes mitocondriales (16s ADNr y cit B) como marcadores moleculares filogenéticos.

Los resultados del análisis multivariado muestran que miembros del grupo Arge (*C. attenuatum*, *C. a. zirahuen*, *C. riojai* y *C. labarcae*) se pueden discriminar mediante la utilización de los caracteres morfológicos: Longitud pedúnculo caudal, distancias del hocico a la primera y segunda aletas dorsales y a la aleta pélvica además de la altura de la primera aleta dorsal. Mientras que miembros del grupo Jordani se pueden discriminar con la utilización de cinco caracteres morfométricos (longitudes cefálica, post-orbital, base de las aletas anal y pectoral, así como la distancia del hocico a la primera aleta dorsal) y dos merísticos (número de rayos de las aletas anal

y pectoral). El mismo análisis hace sugerir que 10 caracteres morfométricos son suficientes para discriminar poblaciones de la especie *C. grandocule* (porcentaje de reclasificación, 98.2%) del Lago de Pátzcuaro, mientras que ocho caracteres merísticos permiten discriminar poblaciones de la especie *C. humboldtianum* (porcentaje de reclasificación, 98.2%). Estos resultados son posteriormente apoyados por el análisis de 11 y 23 loci alozimáticos para *C. grandocule* y *C. humboldtianum*, respectivamente ($\theta_S = 0.0252$, S. D. 0.0126 y $\theta_S = 0.072$, S. D. ± 0.032 , respectivamente). Los resultados preliminares sobre la evolución molecular de los genes mitocondriales 16S ADNr y citocromo b indican y apoyan los mismos resultados alozimáticos y la teoría propuesta por autores extranjeros sobre la reciente diversificación de los miembros del género.

ABSTRACT.

The members of the genus *Chirostoma* are of high ichthyological, economical and cultural relevance in México. They are endemic to the Mesa Central and most of them are threatened and subjected to an indiscriminated management. In México the studies on these species are diverse, however there are no integrative studies that include aspects of their morphological identification and their genetics nor those that relate the changes on their genetic variability over time nor on the molecular evolution of their mitochondrial genome. In this study we present and discuss the results obtained with the morphometric and meristic data (univariate and multivariate analysis) and with the allozyme data of the of 13 species and three subspecies of the genus. We also

discuss the preliminary results on the sequences of the mitochondrial genes (16s DNA & Cyt b) and their utilization to infer phylogenetic relations of the genus. Results of the multivariate analyses showed that members of the Arge group (*C. attenuatum*, *C. a. zirahuen*, *C. riojai* y *C. labarcae*) can be discriminated by utilizing the following morphological characters: caudal peduncle length, distances from the snout to the first and second dorsal fins and to the pelvic fin and the anal fin height. Whereas the members of the Jordani group can be discriminated by utilizing five morphometric (cephalic length, post-orbital length, length of the bases of the pectoral and anal fins and distance from the snout to the first dorsal fin) and two meristic characters (anal and pectoral fin number of rays). Multivariate analyses also suggest that 10 morphometric characters are enough to discriminate among samples/populations of *C. grandocule* from Lake Pátzcuaro (re-classification percentage, 98.2%), whereas eight meristic characters allowed discriminating among samples/populations of *C. humboldtianum* (re-classification percentage, 98.2%). These results are further supported by the allozyme analysis of 11 and 23 loci for *C. grandocule* and *C. humboldtianum*, respectively ($\theta_s = 0.0252$, S. D. 0.0126 y $\theta_s = 0.072$, S. D. ± 0.032 , respectively). Preliminary results on the molecular evolution of the mitochondrial genes 16S rDNA and cytochrome b support the allozyme data on the early theory by other authors on the recent diversification of the members of the genus *Chiostoma*.

INDICE.	Página
Introducción	1
Antecedentes	3
El género <i>Chirostoma</i>	3
Variabilidad morfométrica	12
Variabilidad genética y estructura de poblaciones	13
Filogenia molecular y evolución	16
Marco Teórico	
Variabilidad morfométrica y merística: Análisis estadístico multivariado	21
Marcadores moleculares: Alozimas	26
Variación genética y estructura de poblaciones	31
Estimación de la estructura genética de poblaciones	32
Filogenia molecular y evolución	39
El genoma mitocondrial	42
Objetivos	44
Materiales y métodos	45
Descripción morfométrica y merística	47
Análisis molecular	
Alozimático	53
Análisis de los genes mitocondriales citocromo B y 16s ADNr	57
Resultados y Discusión	
Descripción Morfométrica y Merística	65
Análisis Univariado	102
Análisis Multivariado	
Morfométrico	104
Merístico	112
Análisis Molecular	
Alozimático	119
Análisis preliminar de los genes mitocondriales citocromo b y 16s rDNA	149

INDICE.	Página
Conclusión General	168
Recomendaciones	173
Bibliografía	175
Anexo 1	190
Publicaciones (2001)	
Anexo 2	
Protocolo de tinción de acetatos <i>in extenso</i>	

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Chirostoma* (peces blancos y charales o "silverside fish"), peces endémicos de la Mesa Central de México, son dentro de los atherinópsidos, los menos estudiados y más controversiales en cuanto a su origen y diversificación. El género, incluye a 18 especies y seis subespecies (Barbour, 1973 a y b), de las cuales solamente 18 son válidas taxonómicamente. Presenta en la actualidad a cuatro especies dentro de la NOM-059-Ecol-1994 y el decremento en la abundancia de cuando menos otras tres especies (*C. patzcuaro*, *C. labarcae* y *C. riojai*) podría considerarse como preocupante (Jiménez, 1992; Jiménez y Gracia, 1995; Barriga-Sosa, *et al.* 2001 b). Los estudios nacionales e internacionales sobre estos peces se han enfocado por muchos años a tratar de esclarecer su taxonomía y relaciones filogenéticas, basándose principalmente en caracteres morfo-anatómicos y utilizando pocos individuos de cada una de las especies. Sin embargo, sabemos que la variación a nivel poblacional y/o intra-específica debe de ser considerada ya que estos datos permitirían esclarecer procesos de divergencia o establecimiento de nuevas especies.

Por otro lado, a nivel nacional no existe un programa de rescate o conservación que permita la permanencia de esta riqueza ictiológica en nuestro país. Solamente se conocen programas aislados y enfocados a una u otra de las especies de mayor talla. Sin embargo, para poder plantear un programa de rescate o conservación es necesario el manejo de la información básica sobre las diferentes especies que

conforman al género y entre las que se encuentran: la utilización de un sistema de identificación de especies claro y certero (morfo-anatómico, citogenético o molecular); la valoración del acervo genético del género, de las diversas especies y de las poblaciones de estas especies; además de los aspectos básicos sobre la biología y ciclos de vida.

ANTECEDENTES

EL GÉNERO *Chirostoma*

Origen y Evolución.

Los miembros del género *Chirostoma* son endémicos de la Mesa Central de México, pertenecen a la familia Atherinopsidae y a la Subfamilia Menidiinae (Schultz, 1948) y de acuerdo al registro fósil los atherinópsidos (*Chirostoma* y *Poblana*) se diversificaron entre el Plioceno tardío y el Pleistoceno temprano (5.2 a 1.6 millones de años, ma), debido a eventos geológicos (Álvarez, 1974).

Se han planteado tres hipótesis principales acerca del origen de los atherinópsidos: Álvarez (1972), menciona que la invasión tuvo lugar por la vertiente del Atlántico, cuando algunos organismos quedaron atrapados en un mar interior que ocupó parte de la Mesa Central de México y a los cuales se les puede considerar como ancestros de *Chirostoma*. Estos ancestros posteriormente se diversificaron en *Chirostoma* y *Poblana* cuando el lago de la Cuenca de México vertió sus aguas hacia el occidente para formar la cuenca del Lerma. Otra hipótesis es la de Barbour (1973 a y b), que sugiere que el género tiene un origen difilético durante el Terciario, con un ancestro marino parecido a *Menidia* que penetró por el portal del Balsas al territorio mexicano y que dio origen a los representantes del grupo Jordani en la cuenca Lerma-Santiago. Se postula que mientras este grupo divergía durante el Mioceno otro ancestro marino parecido a *Melaniris* (*Atherinella*) logró entrar a las aguas

epicontinentales, para dar origen a los miembros del grupo Arge. Una tercera hipótesis es la propuesta por Miller (1966), Miller y Chernoff (1979), Miller y Smith (1986), ellos sugieren que entre el Plioceno y el Pleistoceno una especie semejante a *Menidia* penetró al territorio mexicano a través del río Bravo desde la costa del Atlántico, conectada con la Mesa Central a través de un río que posiblemente se dirigía hacia el sur y que estas poblaciones pudieron quedar atrapadas divergiéndose y alcanzando una amplia distribución en la mesa Central.

Barbour y Chernoff (1984) y Echelle y Echelle (1984), con datos osteológicos y genéticos (alozimas), apoyan esta última hipótesis y sugieren que *Chirostoma* comparte con *Menidia* un ancestro común que no comparte con *Melaniris*. Echelle y Echelle (1984), también sugieren que *Chirostoma* y *Poblana* deben de incluirse en un mismo género y que *Menidia* y *Chirostoma* divergieron hace aproximadamente 20.1 ma durante el Eoceno. Recientemente, Coyote (2000), por medio de la utilización de RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA Markers, por sus siglas en inglés), señala que las diferencias encontradas entre los géneros *Chirostoma* y *Poblana* sustentan el que estas sean unidades taxonómicas discretas, pero no hasta el punto de justificar la separación entre estos géneros. Ante dicho problema, tanto investigadores nacionales como extranjeros están tratando de esclarecer de manera más definitiva la situación taxonómica actual y el grado de variación entre especies del género por medio de la utilización de caracteres morfo-anatómicos y moleculares. Entre los primeros se encuentran los trabajos de White (1985) y Dyer y Chernoff (1996), los cuales hacen una valiosa contribución a las relaciones filogenéticas y

evolutivas de varias subfamilias de los Atherinopsidae, incluyendo a los Menidiinae (Schultz, 1948). Sin embargo dicha contribución está enfocada a niveles taxonómicos superiores y solamente en el primer trabajo se incluyen a unos pocos miembros del género *Chirostoma* (*C. grandocule*, *C. sphyraena* y *C. labarcae*).

Descripción y Taxonomía .

Desde sus primeras descripciones hasta la actualidad estos peces han presentado conflictos taxonómicos y filogenéticos debido a su reciente origen, al traslape en su distribución, la hibridación natural entre algunas de las especies y la poca diferenciación morfológica inter-específica. Por ejemplo, la primera descripción que definió al género como taxon válido fue la de Swaison (1839) quien reconoció a un solo género. Posteriormente Jordan y Evermann (1896), consideraron dos géneros, *Chirostoma* y *Eslopsarum*. Meek (1904), consideró solamente a un género con tres subgéneros, *Chirostoma*, *Eslopsarum* y *Lethostole*. Jordan y Hubbs (1919) estiman que no había diferencias consistentes entre los subgéneros, por lo que sugirieron la desaparición de los mismos. De Buen (1945) retoma la existencia de tres géneros distribuidos en seis subgéneros. Álvarez (1950), reconsideró la no-existencia de los subgéneros, pero sugirió dos géneros, *Chirostoma* y *Otalia*.

Hasta nuestros días la taxonomía que se maneja es la sugerida por Barbour (1973 a y b), quien después de varios análisis morfométricos reconoce a un solo género con 18 especies y seis subespecies, y los divide en dos grupos diferentes: el grupo Arge y el grupo Jordani. Estos difieren principalmente por presentar el grupo Jordani

mayores valores merísticos (ej. número de escamas de la serie longitudinal, branquiespinas, etc.) y por el tipo de escamas que presentan, por ejemplo, el grupo Arge presenta escamas con poros, mientras que el grupo Jordani escamas con canales (con excepción de *C. jordani* que presenta ambas características). El grupo Jordani incluye a especies relativamente pequeñas (*C. jordani*, *C. patzcuaro* y *C. chapalae*) y a un grupo de nuevas especies que a partir de un ancestro parecido a *C. humboldtianum* incrementaron su tamaño, número de escamas, radios de las aletas, branquiespinas y vértebras, creyéndose que de dicha diversificación se dio origen a *C. lucius*, *C. sphyraena*, *C. promelas*, *C. estor*, *C. consocium* y *C. humboldtianum* (Barbour, 1973 b). El resto de las especies y una subespecies han sido situadas dentro del grupo Arge, que se caracteriza por presentar menores valores merísticos (*C. arge*, *C. melanocus*, *C. riojai*, *C. charari*, *C. attenuatum*, *C. attenuatum zirahuen*, *C. bartoni*, *C. aculeatum* y *C. labarcae*).

De manera práctica y durante cientos de años, en nuestro país se ha dividido a los miembros del género en dos grandes grupos, principalmente en función de su tamaño: los peces blancos y los charales. En el primer grupo se incluyen especies que habitan tanto en el Lago de Pátzcuaro como el Lago de Chapala, como son: *C. estor*, *C. estor copandaro*, *C. lucius*, *C. sphyraena*, *C. promelas* y *C. humboldtianum*, con tallas que van de 165 a 420 mm de longitud estándar (LS) (Barbour, 1973 a; Alaye, 1993 b; Torres-Frías, 1998). Son peces con cuerpo elongado, fusiforme, esbelto y lateralmente comprimido, cabeza grande cubierta de escamas, mandíbula inferior proyectada por delante, la boca es terminal, superior, oblicua y provista de

dientes. Presentan de 64 a 82 escamas en una serie longitudinal. Son de color amarillento con una línea longitudinal oscura que va desde la cabeza hasta el extremo pedúnculo caudal (Orozco y Torres, 1981). El grupo de los charales incluye peces con tallas que van de los 45 a 160 mm LS (Barbour, 1973 a; Sánchez, 1992; Alaye, 1993 b y Torres-Frías, 1998), se localizan en ambos lagos, así como en los Lagos Zirahuén y Cuitzeo y Laguna de Zacapú, en Michoacán; en los lagos del Valle de Toluca, Edo. de México, además de los lagos de Juanacatlán, Jalisco, Santa María y San Pedro Lagunillas en Nayarit, en donde son parte importante de la economía de las poblaciones locales. El nombre charal deriva del P'urhépecha *charare*, que se asigna a especies de tallas pequeñas, con el cuerpo alargado y fulsiforme, el hocico ligeramente puntiagudo y la boca oblicua con pequeños dientes.

En general, los dos tipos de peces (charal y peces blancos) habitan aguas lénticas, claras o medio turbias con poca vegetación, son organismos bentónicos que prefieren los fondos arenosos o granulados (Secretaría de Pesca, 1994 a). Su alimentación varía de acuerdo a su estadio, como alevines consumen protozoarios, algas e insectos. Su reproducción es ovípara y desovan durante todo el año, acentuándose en el charal de enero a mayo y en el pez blanco de enero a agosto; prefieren para ello las orillas de los cuerpos lacustres con aguas claras, poco oleaje y temperaturas de 18 a 23° C (Solórzano, 1963). Una problemática en la práctica es que los peces blancos y charales de tallas pequeñas o en estadios juveniles son confundidos, por lo que son explotados indiscriminadamente como charales.

Los organismos del género *Chirostoma* incluidos en el presente estudio se considerarán dentro de la taxonomía general y en relación con las categorías supragenéricas, con lo recomendado recientemente por Dyer y Chernoff (1996) y White (1985). Mientras que para las categorías infragenéricas se utilizó la clasificación de Barbour (1973 a), presentándose como sigue:

Phyllum Chordata

Subphyllum Vertebrata

Grupo Gnatostomata

Superclase Pisces

Clase Osteichthyes

Subclase Actinopterygii

Superorden Teleostei

Orden Atheriniformes (Rosen)

Familia Atherinopsidae (Fowler)

Subfamilia Menidiinae (Schultz)

Tribu Menidiini (Shultz)

Género *Chirostoma* (Swainson)

13 especies y tres subespecies

Características generales de la distribución y problemática de las especies incluidas en el presente trabajo se presentan en la Tabla 1. Sin embargo cabe hacer notar que ésta información se encuentra disponible en su totalidad solamente para algunas de las especies, por lo que no es uniforme.

Tabla 1. Aspectos biológicos y distribución de las especies de *Chirostoma* incluidas en el presente estudio. M =carácter morfométrico, m= carácter merístico y g = carácter genético; < ó >, indican mayores o menores valores.

Especie/Aspecto	Distribución Geográfica	Distribución Local	Introducción	Traslapa con sp.
Grupo Jordani				
<i>C. consocium</i>	- L. Chapala, Río Grande, Poncitlán, Jal. ^g	Todo lago, fondo, norte y sur ^u	¿?	<i>C. chapalae</i>
<i>C. c. reseratum</i>	- Presa Sn. Juan Cotija, Mich. ^g - L. Chapala, Jal. ^g	Todo lago, fondo, norte y sur ^u	¿?	<i>C. consocium</i> <i>C. humboldtianum</i> ^g
<i>C. chapalae</i>	- L. Chapala, Jal. ^g	Todo lago, zona litoral ^h	¿?	<i>C. consocium</i>
<i>C. estor</i>	- L. Pátzcuaro, Mich. ^{1,h,n,1} - L. Chapala, Jal.	Cambiado c/tiempo ^b	Diversos cuerpos Agua, país.	
<i>C. e. copandaro</i>	- L. Zirahuén, Mich. ^g	¿?	¿?	<i>C. estor</i> <i>C. humboldtianum</i> ^g
<i>C. grandocule</i>	- L. Pátzcuaro, Mich. ^g	Zonas profundas	¿?	
<i>C. humboldtianum</i>	- L. Pátzcuaro, L. Zacapú, Mich. - Xochimilco, Edo. Mex. ^c - L. Juanacatlán, Jal. - L. Sta. Maria y Sn. Pedro Lagunillas, Nay. ^g	¿?		<i>C. c. reseratum</i>
<i>C. jordani</i>	- Río Lerma, La Alberca, Gto. - L. Cuitzeo, Mich. - Can. Valle México. - El Carmen, Tlax. - Río Grande, Poncitlán, L. Chapala, Jal. ^g	¿?	¿?	
<i>C. lucius</i>	- L. Chapala, Río Grande, Poncitlán, Jal. ^g	Toda columna lago, norte y sur ^u	L. Pátzc. ^m , Ctro. Acuic., Zacapú, Mich. ^f	<i>C. ocotlanae</i>
<i>C. patzcuaro</i>	- L. Pátzcuaro, Mich.	¿?		¿?
<i>C. promelas</i>	- L. Chapala, Jal. ^g	Toda columna lago, norte y sur ^u	Ctro. Acuic. Tizapán, Jal. ^f	<i>C. sphyraena</i>
<i>C. sphyraena</i>	- L. Chapala, Río Grande, Poncitlán Jal. ^g	¿?	¿?	¿?
Grupo Arge			¿???	¿?
<i>C. attenuatum</i>	- L. Pátzcuaro, Mich. ^g	Litoral y profundidad media ^{b,d}	¿?	<i>C. a. zirahuen</i>
<i>C. a. zirahuen</i>	- L. Zirahuén, Mich. ^g	¿?	¿?	<i>C. attenuatum</i>
<i>C. labarcae</i>	- L. Chapala, Río Grande, Poncitlán y Río Lerma, La Barca ^g	¿?	¿?	¿?
<i>C. riojai</i>	- Río Lerma y Lagos del Valle de Toluca, Edo. México ^{g,e}	¿?	¿?	¿?

Continua Tabla 1.

Continua Tabla 1.

Especie/Aspecto	Hibridación	Carácter (M) distintivo	Carácter (m) distintivo	Hábitos Alimenticios	Desove	Prop. Sexual	Ref.
Grupo Jordani							
<i>C. consocium</i>	¿?	No se encuentra ^g	No se encuentra ^{o, q}	Carnívoro zooplanc. y MONI ^v	Litoral, poca profundidad, todo año ^u	0.6:1 h:m ^w	g, o, q, u, v, w
<i>C. c. reseratum</i>	¿?	<LBAA ^g (C. con) >DHAp ^g (C. humb)	>EPD ^g (C. con) >BE ^g (C. humb)	Carnívoro zooplanc. y MONI ^v	Litoral, poca profundidad, Todo año ^u	0.6:1 h:m ^w	g, q, u, v, w
<i>C. chapalae</i>	<i>C. consocium</i> ^a	LS ^a	No se encuentra ^{o, q}	Carnívoro zooplanc. ^g	Litoral, poca profundidad ^g	0.6:1 h:m ^w	a, g, o, q, h, w
<i>C. estor</i>	<i>C. attenuatum</i> , <i>C. patzcuaro</i> , <i>C. grandocule</i> ^{i, k}			Carnívoro Cambia c/talla ^l	Zona litoral, Norte lago, c/desoves múltiples ^p	¿?	b, f, h, i, k, l, n, p
<i>C. e. copandaro</i>	¿?	<LC, LH, LM ^g	>EPD ^g <ELL y EPD ^g	¿?	¿?	¿?	g
<i>C. grandocule</i>	<i>C. estor</i> ^l		<BE ^g	Carnívoro zooplanc. especializ. Cladóceros ^j	Todo el año ^d	4:1 h:m ^l	d, g, i, j, l
<i>C. humboldtianum</i>		>DHAp ^g (C. c. reseratum)	>BE ^g (C. c. reser)	Carnívoro zooplanc	¿?	¿?	g, c
<i>C. jordani</i>	¿?		Escamas c/poros o canales ^g , ELL, EPD ^g	¿?	¿?	¿?	g
<i>C. lucius</i>	¿?	No se encuentra ^g	No se encuentra ^g	Carnívoro zooplanc., especializado microcrus. ^v	Litoral, poca profundidad, todo año ^u	0.75:1 h:m ^w	g, m, r, u, v, w
<i>C. patzcuaro</i>	¿?	¿?	¿?	Carnívoro zooplanc. especializ. Cladóceros ^j	Febrero-junio ^s	¿?	j, s
<i>C. promelas</i>	¿?	>LM ^g (C. sphy)	¿?	¿?	Litoral, poca profundidad, todo año ^u	0.75:1 h:m ^w	g, r, u, w
<i>C. sphyraena</i>	¿?	¿?	¿?	Carnívoro zooplanc., especializado microcrus. ^v	Litoral, poca profundidad, todo año ^u	0.75:1 h:m ^w	g, u, v, w
Grupo Arge	¿?	¿?					
<i>C. attenuatum</i>	¿?	¿?	> ELL, EPD ^g (C. a. zirahuen)	Carnívoro zooplanc. especializ. Cladóceros ^t	Septiembre a Agosto ⁿ	1.7:1 H:M ^t	g, b, d, ñ, t
<i>C. a. zirahuen</i>	¿?	¿?	<ELL, EPD ^g	¿?	¿?	¿?	g
<i>C. labarcae</i>	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	g
<i>C. riojai</i>	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	G, e

a = Jordan y Hubbs, 1919; b = De Buen, 1940; c = Martín del Campo, 1955; d = Solorzano, 1962; e = Solórzano y López, 1965; f = Rosas, 1967; g = Barbour, 1973 a; h = Lara, 1980; i = Ledesma, 1990; j = García, 1990; k = Estrada, 1991; l = Sánchez, 1992; m = Alaye, 1993 a; n = Rosas-Monge, 1994; ñ = Morelos y Guzmán, 1995; o = Enriquez y Paulo-Maya, 1997; p = Soria-Barreto, 1998; q = Paulo-Maya, 2000; r = Barriga *et al.*, 2001 b; s = Rauda, 1987; t = García, 1990; u = Guzmán y Ortiz, 1995; v = Arriaga, *et al.* 1995; w = Guzmán *et al.*, 1995; ¿? = no se tiene información.

Hibridación.

El término hibridación en la taxonomía tradicional se define como a la progenie producto de una cruce entre especies. En peces parece ser un evento común y este frecuentemente ocurre después de trasplantes hechos por el hombre (Avisé, 1994). La hibridación e hibridación introgresiva (cruza de híbridos F1 con especies progenitoras) son comunes en peces (Hubbs, 1955; Crabtree y Buth, 1987; Campton, 1987; Verspoor y Amar, 1991) y han sido documentadas para varias especies de atherinópsidos (Hubbs y Drewry, 1959) y verificadas electroforéticamente en catostomidos (Crabtree y Buth, 1987), tilapia (Gregg *et al.*, 1998) y salmónidos (Nyman, 1970; Crozier, 1984; Jansson y Öst, 1997), entre otros. En los cuerpos de agua epicontinentales de México, los trasplantes de peces del género *Chirostoma* son numerosos. Por ejemplo, García (1976) menciona que como consecuencia de los programas de repoblación con los quirostomas del Lago de Pátzcuaro, se han obtenido ejemplares que no tienen caracteres específicos y que caen dentro de la categoría de híbridos. Por otro lado, la hibridación entre especies de peces blancos y charales ha sido experimentalmente demostrada (Ledesma, 1990 y Estrada, 1991) y se reporta la evidencia electroforética de la molécula de la hemoglobina para híbridos de *C. estor* x *C. lucius* del Lago de Pátzcuaro (Alaye, 1996 b) aunque se desconoce el impacto de dicho evento.

VARIABILIDAD MORFOMÉTRICA.

En peces atherinópsidos la variabilidad morfométrica es amplia y diversos autores han utilizado métodos estadísticos univariados y multivariados en busca de caracteres morfométricos y/o merísticos que les permitan discriminar a varias de las especies del género *Chirostoma*. Por ejemplo, Barbour y Chernoff (1984), utilizan el análisis de Componentes Principales (ACP) y aplican el análisis en 19 variables morfométricas y 7 merísticas para discriminar a los peces blancos del Lago de Chapala, considerando que ocho variables morfométricas relacionadas con la cabeza y la habilidad natatoria son suficientes para discriminar entre *C. promelas*, *C. sphyraena* y *C. lucius* (aunque reportan el problema de diferenciar a los híbridos). Rodríguez y Granado (1987 y 1988 a y b), utilizan ACP, análisis de factores discriminantes (AD) y de correspondencia (CO) para elucidar características morfo-funcionales de tres especies de *Chirostoma* del Lago de Chapala, para determinar la diferenciación entre cinco especies simpátricas del mismo lago y para establecer relaciones entre las características morfológicas del aparato bucal y el hábitat alimenticio de estas especies.

Otros estudios sobre miembros del género incluyen aspectos relacionados con las relaciones inter-específicas y filogenéticas y la diferenciación de híbridos. Por ejemplo, Álvarez (1969) y Barbour (1973 a y b) establecen las posibles relaciones de todos los miembros del género (19 especies y tres subespecies), por medio de la utilización de caracteres morfométricos. El primer autor utiliza 16 caracteres

morfométricos y 7 merísticos y el segundo utiliza 19 caracteres morfométricos y 9 merísticos. Por otro lado, Alaye (1993 b), utiliza 18 variables morfométricas y 6 merísticas para discriminar especies e híbridos del Lago de Pátzcuaro.

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES.

En todos los sistemas biológicos, el conocimiento sobre la estructura de poblaciones es cada vez más importante, ya que la variabilidad genética en poblaciones naturales tiene un impacto directo en la sobrevivencia y en la reproducción (Carvalho, 1993). Este concepto se relaciona con la posibilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios en las condiciones ambientales y a la posibilidad de incrementar la resistencia a enfermedades (Allendorf y Leary, 1997). Por otro lado, es crucial el conocer y entender la estructura genética de las poblaciones para mantener y conservar especies en peligro y/o amenazadas y para una adecuada explotación del recurso: a efectos de conservación se considera que el detectar la diversidad en y entre especies o poblaciones es importante porque por medio de la utilización de marcadores neutrales se pueden delinear barreras de unidades evolutivas (Vrijenhoek, 1998), o a efectos de la explotación del recurso porque la explotación de poblaciones mezcladas generalmente lleva a la disminución o pérdida de las poblaciones menos productivas (O'Connell *et al.*, 1998). Se sabe que las poblaciones de peces de aguas dulces son más fáciles de definir que las marinas, sin embargo la diferenciación de poblaciones puede ocurrir inclusive en un mismo lago o río cuando

las poblaciones se exponen a condiciones ambientales contrastantes y/o cuando ocurre intercambio de sólo algunos organismos migratorios. Estos cambios genéticos pueden inclusive ocurrir en pocos años (Carvalho, 1993; Ward *et al.*, 1994).

Los estudios sobre la variabilidad genética y/o la estructura genética de poblaciones de miembros del género *Chirostoma* son escasos. Solamente en el estudio de Echelle y Echelle (1984), se presentan datos generales sobre la variabilidad genética de 16 especies del género, la cual se describe como baja ($P_{.95} = 13.6$ y $H_e = 0.042$), aunque dentro de los valores observados para otros grupos de peces. Sin embargo, el principal objetivo de estudio de los autores versa sobre aspectos evolutivos del género y otros aterínidos, por lo que el diseño del trabajo no requiere de un número de muestra estadísticamente representativo como para describir aspectos de variabilidad o estructura genética.

A nivel molecular y en México, se han realizado en los últimos años estudios con diversas especies del género en donde se plantean tanto aspectos que determinen la discriminación de especies, como otros relacionados con la variabilidad genética de especies del género. Por ejemplo, Coyote (2000), utiliza RAPD's (Random Amplified DNA, por sus siglas en inglés) para analizar las relaciones taxonómicas entre las especies del género *Poblana* y *Chirostoma* y sustenta que estas son unidades taxonómicas discretas, pero no géneros separados.

En los trabajos de Rincón (1992) y Alaye (1996 a), se utiliza la molécula de la

hemoglobina para discriminar especies del Lago de Pátzcuaro con base en el número e intensidad de bandas electroforéticas, además de la discriminación de híbridos (*C. lucius* x *C. estor*) por medio de caracteres morfométricos, merísticos y el patrón e intensidad de cuatro bandas electroforéticas de la hemoglobina.

Por otro lado y como resultado del presente trabajo, Barriga-Sosa *et al.*, (2001 b), muestran que, para al menos dos de las especies del género (*C. humboldtianum* y *C. grandocule*), se detecta una estructura genética tanto a nivel intra-lacustrino como entre lagos o cuerpos de agua. Por otro lado Barriga-Sosa *et al.*, (en prep.) confirman la existencia de variabilidad intra-específica en la especie *C. grandocule* del Lago de Pátzcuaro y plantean la necesidad de ampliar los estudios genéticos para poder sugerir estrategias de manejo y conservación de algunas de estas especies. En el primer trabajo, se sugiere una estructura putativa poblacional en dos de las especies analizadas y se menciona que los cambios observados y la diferenciación de las poblaciones esta influenciada por aspectos relacionados con el manejo y explotación de estas especies además de por factores ambientales. En el segundo trabajo, se investiga la estructura genética de dos “subpoblaciones” de *C. grandocule* y se sugiere que la especie se encuentra en un proceso de diferenciación que requiere de un constante monitoreo y una re-estructuración de la actividad pesquera.

FILOGENIA MOLECULAR Y EVOLUCIÓN.

En peces aterinópsidos las estimaciones de la filogenia molecular y evolución se limitan a dos estudios (Johnson, 1975; Echelle y Echelle, 1984) y a los derivados de la presente tesis (Barriga-Sosa *et al.*, 2001 b y en prep.). El trabajo de Johnson (1975) se basó en las relaciones taxonómicas e historia evolutiva de aterinópsidos del género *Menidia* (*M. audens*, *M. beryllina*, *M. extensa*, *M. peninsulae* y *M. menidia*), utilizando 24 loci génicos. De dicho trabajo se concluye que cinco especies analizadas se definen como poblaciones locales y que tres de las especies se pueden considerar como taxa distintos (*M. extensa*, *M. peninsulae* y *M. menidia*).

El trabajo de Echelle y Echelle (1984), por otro lado, fue más amplio y se refiere a la genética evolutiva de los aterinópsidos de la Mesa Central incluyendo a 15 de las 18 especies (21 poblaciones) de *Chirostoma* validadas taxonómicamente por Barbour (1973 a), dos especies de *Poblana*, dos de *Menidia* y 23 loci génicos. Los autores concluyen que los miembros de los géneros *Chirostoma* y *Poblana* comparten con *Menidia* un ancestro que no comparten con otros aterinópsidos y que los primeros deberían ser incluidos en el género *Menidia*. Además sugieren la hipótesis, que prevalece hasta nuestros días de que este es un grupo monofilético que divergió de manera rápida en la Mesa Central y que *Chirostoma* y *Poblana* deberían ser sinonimias e incluirse junto con *Menidia* en un solo género. Los autores también sugieren que *Menidia* y *Chirostoma* divergieron hace aproximadamente 20.1 ma durante el Eoceno.

Los trabajos de Barriga-Sosa *et al.* (2001 b) y (en prep.) son más puntuales y se enfocan en el análisis de la variación morfológica y genética de las siete especies que conforman el “grupo *humboldtianum*” y la estructura de poblaciones de la especie *C. grandocule*. Los resultados del primer trabajo concuerdan con los de Echelle y Echelle (1984), en donde se concluye que existe suficiente diferenciación genética entre las especies analizadas. Dichos resultados son apoyados por los datos morfométricos, sugiriéndose que tanto genética como morfológicamente existe diferenciación intra-específica en algunas de las especies. La hipótesis anterior es ampliada y justificada posteriormente para la especie *C. grandocule* (Barriga-Sosa *et al.*, en prep.). Dichos resultados son novedosos en cuanto a que sugieren que las especies del género se encuentran en un proceso continuo y reciente de especiación.

La utilización de secuencias de nucleótidos de genes o regiones mitocondriales o nucleares para inferir relaciones filogenéticas y evolución de diversos grupos de peces es muy amplia y ha demostrado ser muy eficiente en la mayoría de los casos. Los genes mitocondriales citocromo b (cit B) y 16S ADNr son entre otros de los marcadores más utilizados para inferir filogenias y modos de especiación de gran cantidad de peces. Por ejemplo, Lyderad *et al.* (1995), utilizan el gen cit B para investigar la divergencia de las secuencias y la filogenia molecular de 25 especies de peces del género *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) y determinan que existen diferencias hasta de 17.9% de los codones (con reemplazamiento de amino ácidos, lo que sugiere un patrón evolutivo no aleatorio). La tasa de divergencia en

general parece ser más lenta en estos organismos que en otros vertebrados, por lo que no pudieron determinar relaciones de manera precisa entre especies o grupos.

Roe *et al.* (1997), utilizan el gen cit B completo para inferir las relaciones filogenéticas y la evolución de la especialización trófica de 22 taxa (*Cichlasoma*) y para determinar si la separación de las secciones Thorichthys y Amphilophus tiene un ancestro común. Los resultados moleculares revelan que la sección Thorichthys es un grupo natural, mientras que la sección Amphilophus es parafilética en donde los filtradores del sustrato y los predadores generalizados forman dos clados separados, por lo que sus resultados sugieren que ambos grupos no comparten un ancestro común y los autores sugieren el replanteamiento de la evolución del grupo. .

Kiril'Chik y Slobodyanyuk (1997) utilizan una fracción del mismo gen para investigar la evolución de este en especies de peces Cottoides del Lago Baikal en Rusia y de otras regiones. Sus resultados muestran que el cit B en las especies del Lago Baikal presentan altos niveles de sustituciones sinónimas y sugieren que la acelerada acumulación de sustituciones, junto con la intensa formación de especies, es la probable razón del fenómeno de sustituciones sinónimas. Además mencionan que el esquema del análisis filogenético de secuencias de nucleótidos, indica un origen reciente (en la escala geológica) de los peces Cottoides del Lago Baikal (no mayor de 2 ma) a partir de uno o pocos ancestros de formas dulceacuícolas filogenéticamente relacionadas.

Zardoya y Doadrio (1998) analizan las relaciones filogenéticas de los ciprínidos Ibéricos por medio de la utilización del gen cit B completo. En su estudio incluyen a representantes de Europa, Asia y Africa del Norte y concluyen que la filogenia resultante es congruente con la generada por medio de caracteres osteológicos. Los autores concluyen que los ciprínidos Ibéricos se agrupan en cinco linajes, y que esta reducción en el número de linajes puede explicarse con la historia geográfica de aislamiento de la Península. Además, mencionan que el análisis filogenético indica que las especies de Africa y Asia son los grupos hermanos de las especies Ibéricas, lo cual apoya la hipótesis de colonización de la ruta sur-oriental.

Van Der Bank *et al.* (1998) investigan la especiación de poblaciones del pez gato (*Schilbe intermedius*) del norte y sur de Africa a través de alozimas y del gen cit B. Los autores demuestran que la distancia entre las poblaciones del sur (*Schilbe/Eutropius*) es mayor (3.2-3.5%) que la distancia entre las poblaciones del sur y las del norte (*Schilbe/Schilbe*). Concluyen que sus datos junto con los revelados por los de relaciones evolutivas sugieren que existe suficiente diferenciación entre las poblaciones como para tratarlas como especies distintas.

Por otro lado Gilles *et al.* (1998), investigan la filogenia mitocondrial, sus implicaciones en la sistemática, evolución reticulada y tiempo de colonización de los ciprínidos europeos. Los autores se basan en las secuencias de los genes mitocondriales cit B y 16S ADNr y concluyen que ambos genes originan una misma filogenia europea y que existe hibridación inter-genérica e inter-específica, lo cual es

apoyado por caracteres morfológicos. Además utilizan las secuencias del gene 16S ADNr de taxa no-introgresivos para inferir el tiempo de divergencia de los primeros ciprínidos europeos y concluyen que las subfamilias de estos peces comenzaron a diversificarse hace aproximadamente 35 ma.

Por otro lado, Meyer *et al.* (1998), investigan la filogenia de peces cíclidos africanos por medio del marcador nuclear DXTU1 y de marcadores mitocondriales (segmentos del Cit b y de la región de control). Los autores reportan que las filogenias basadas en las regiones mitocondriales apoyan la idea de la monofilia del “super-grupo” (super-flock) del lago Victoria pero son ambiguos para determinar la filogenia de la agrupación del lago Malawi.

Para el género *Chirostoma* los estudios del ADNmt o cualquier secuencia de ADN, sin embargo son inexistentes. Para peces aterinomorfos solamente se reporta el trabajo de Murphy y Collier (1997), sobre la filogenia molecular de peces aplocheiloides. En él se describen la importancia de la vicarianza y los orígenes del anualismo basados en regiones de los genes mitocondriales cit B, 12S y 16S ARNr. Estos peces son anuales y sus embriones tienen la habilidad de entrar en etapas de pausa durante su desarrollo, cuando se encuentran en condiciones ambientales adversas. Los autores proponen una nueva hipótesis de las relaciones de estos peces y reportan que el análisis filogenético con máxima parsimonia indica que el posicionamiento de los taxa de Indo-Malasia y Madagascar, con relación a una

dicotomía monofilética de América del sur/Africa, sugiere la importancia de la vicarianza en la diversificación del grupo.

MARCO TEORICO

VARIABILIDAD MORFOMÉTRICA.

Análisis estadístico multivariado.

Una de las herramientas en el análisis de la taxonomía numérica es la utilización de las técnicas de Análisis Multivariado, las cuales pueden ser utilizadas para encontrar las relaciones que ligan los caracteres cuantitativos, cualitativos y la mezcla de ambos con el fin de seleccionar cuáles caracteres determinan la variabilidad morfológica de cada organismo. El análisis morfométrico tiene la ventaja de ser una herramienta sencilla y de bajo costo. La caracterización morfométrica de algunas especies a menudo involucra el descubrimiento de diferencias sutiles en las variaciones de forma, independientemente del tamaño (Eknath *et al.*, 1991).

Dentro de las ventajas del análisis multivariado se encuentra la inclusión de todos los métodos estadísticos que analizan simultáneamente más de dos variables en un muestreo de observaciones, constituyendo una extensión del análisis monovariado y del análisis bi-variado. Permite establecer, a partir de numerosos datos, ciertas relaciones y leyes operativas, ensayar diversas maneras de organizar dichos datos en estructuras conocidas y fácilmente utilizables además de transformar y presentar

en forma nueva los numerosos datos iniciales, reduciéndolos sin perder demasiada información inicial hasta constituir con ellos un resumen relativamente exhaustivo del conjunto de partida habitualmente complejo y con información redundante (Pérez, 1996).

Los métodos multivariados son comúnmente utilizados en casos en que las especies o poblaciones están tan relacionadas que los caracteres por sí mismos no pueden separarlas (Vreven *et al.*, 1998, Teugels y Vreven, 1998).

Lefebvre (1976) sugiere que el análisis multivariado se puede comparar con un análisis de microscopio ya “que da una visión parcial deformada de la estructura, por lo que se requiere de diferentes tratamientos para poder obtener una interpretación válida”. Es necesario practicar diferentes tipos de análisis a la misma matriz para poder obtener resultados más precisos y objetivos, ya que si los resultados son consistentes también lo serán las conclusiones (de lo contrario, los resultados dependerán de los métodos utilizados). Lo anterior significa que los diversos métodos multivariados no son excluyentes (Bisquerra, 1989).

En general, dichos análisis nos permiten conocer la afinidad que existe entre dos entidades o, por el contrario, la diferencia entre las mismas con base en los diversos caracteres que la describen, por lo que esta inter-relación de caracteres origina nuevas relaciones de dependencia e independencia dentro de un complejo descriptivo (Oseguera, 1990 y Rodríguez, 1991).

El análisis multivariado se aplica bajo las siguientes premisas: 1) Las variables son dependientes y de naturaleza similar, 2) ninguna variable tiene una importancia mayor que otra y 3) pueden destacar componentes de "tamaño" y "forma". En el presente trabajo el tamaño se considera equivalente al crecimiento, por lo que el crecimiento de un organismo estará representado por n medidas de otros caracteres biométricos. La forma, por otro lado, es un concepto independiente del tamaño, es decir, al comparar dos individuos estos deben tener el mismo tamaño pero distinta forma o viceversa (Fisher y Belle, 1993). El análisis de datos morfométricos relacionados con la forma tiene fundamentalmente tres ventajas: 1) ayuda a superar el problema de que a medida que aumenta el número de pruebas estadísticas realizadas a un determinado nivel de significancia así aumenta la probabilidad de encontrar por lo menos un resultado significativo, 2) las pruebas multivariadas son más sensibles para detectar diferencias de grupos que dependen de ciertas relaciones entre las variables dependientes y 3) existen métodos de Análisis Multivariado que no tienen un análogo univariado y sólo pueden realizarse cuando hay más de una variable dependiente (Elston y Jhonson, 1990). Las técnicas multivariadas se apoyan con el cálculo de ponderancia (subdivisión de varianza) para cada carácter o combinando ambos (ponderancia y carácter) en una misma dirección para cada especie. Estos análisis generalmente se emplean con especies muy próximas, en donde los caracteres por sí solos no separan a todos los especímenes (Fisher y Belle, 1993).

Entre los diferentes análisis multivariados que se pueden llevar a cabo, se encuentran los métodos que son descriptivos y exploratorios y que no requieren de una hipótesis previa, por ejemplo, el análisis de componentes principales (ACP) y de correspondencia (CO). Dentro de los comprobatorios y que requieren de una hipótesis previa se encuentra el Análisis Discriminante (AD).

Los análisis de Componentes Principales (ACP) y de Correspondencia (CO) son análogos y no requieren de que los organismos sean identificados *a priori*, por lo que se puede examinar el patrón de los valores de los organismos en los gráficos para evaluar la premisa inicial de que todos los organismos pertenecen a la misma especie o población (Barbour y Chernoff, 1984) y/o para buscar la relación que liga a los caracteres que determinan la variabilidad morfológica en cada especie o población (Castello, 1983; Rodríguez y Granado, 1987 y 1988). El ACP está diseñado para reducir el número de variables que se deben considerar a un número pequeño de componentes (componentes principales) o índices los cuales son combinaciones lineales de las variables originales. Si no existe correlación entre las variables originales el análisis no se considera como válido, por lo que los mejores resultados se obtienen cuando las variables originales están altamente correlacionadas positiva o negativamente (Manly, 1986).

El análisis discriminante (AD), por otro lado, es utilizado para analizar muestras de diferentes especies o poblaciones que presenten una dispersión común que les permita localizarse en el modelo "más parsimonioso" capaz de describir

efectivamente las diferencias entre los grupos analizados. Los resultados de este análisis se pueden describir en tres términos principales: 1) el número de funciones discriminantes resultantes y la importancia relativa de cada una de estas; 2) la localización de cada función discriminante como vector de referencia en una dimensión de un subespacio del espacio total expresado en términos de la estructura de coeficientes de correlación y 3) el mapeo de los grupos en el espacio discriminante, con los promedios y desviación estándar de los grupos en las funciones (Coley, 1971). Con el análisis discriminante (AD) se calcula la distancia generalizada (F-test, Sokal y Rohlf, 1995), la cual elimina los efectos de correlación entre los caracteres utilizados. Esta distancia explica las diferencias entre cada grupo y su centroide (dispersión) y se apoya en la subdivisión de la varianza de cada carácter y sus combinaciones (ponderancia y caracteres) en la misma dirección y para cada especie o población (Rodríguez y Granado, 1987 y 1988).

MARCADORES MOLECULARES.

ALOZIMAS.

Las isoenzimas (isozimas) son enzimas funcionales de formas físicamente distinta pero con la misma actividad catalítica donde se incluyen polímeros de subunidades generados por loci genéticos diferentes o por alelos diferentes del mismo locus. Las isoenzimas incluyen productos heteroméricos de loci múltiples, variantes post-traslacionales y otras alteraciones de las proteínas (Avice 1994). Las alozimas. Por su parte son isoenzimas cuyas variantes polipeptídicas son considerados como formas alélicas alternativas del mismo locus génico (Murphy *et al.*, 1990). Estas proteínas están formadas por aminoácidos unidos por enlaces polipeptídicos y la secuencia (estructura primaria) de estos se determina genéticamente. La migración de estas proteínas en geles de electroforesis ha permitido hacer de éstas uno de los métodos más eficientes para investigar fenómenos genéticos a escala molecular (Hillis y Moritz, 1990). Un factor importante al considerar a las isoenzimas como herramientas moleculares es el reconocer que aspectos como la expresión y duplicación de genes pueden influir en la interpretación de nuestros resultados [la expresión de productos génicos por ejemplo está sujeta a variaciones temporales, (ontogénicas) y espaciales (célula/tejido) en los organismos].

La migración de estas proteínas en una matriz (almidón, acetato de celulosa, etc.) durante la electroforesis se debe a la carga de las cadenas de aminoácidos: básica o positivamente cargada (NH_3^+ ; lisina, arginina e histidina) o acídica o negativamente

cargada (COO^- ; ácido aspártico y ácido glutámico). La carga neta de cada proteína varia con el pH, para valores bajos de pH los grupos amino se cargan positivamente (cationes). Para valores altos de pH, los grupos carboxilo se cargan negativamente (aniones). Los aminoácidos sin carga son no-polares o hidrofóbicos o en su caso polares. Cuando las proteínas alcanzan un equilibrio de cargas positivas o negativas se dice que alcanzan su punto isoeléctrico. El tamaño y la forma de la proteína también tienen efectos en la migración. Muchas proteínas contienen más de una cadena polipeptídica (subunidad), unidas por puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, puentes disulfuro y/o interacciones hidrófobas.

Los objetivos de la electroforesis de proteínas son los de encontrar cambios ocurridos por mutaciones en las secuencias de aminoácidos que codifican locus específicos de ADN, cambios que puedan observarse en la alteración de la forma, carga, eficiencia catalítica y estabilidad de la molécula (Hillis y Moritz, 1990).

El método más frecuente para la visualización de las proteínas es la tinción histoquímica específica, la cual consiste en proveer a la proteína de un sustrato específico que permita catalizar una reacción en particular normalmente visualizada con luz normal o con luz ultravioleta. Cada tinción contiene, además del sustrato necesario para la enzima, co-factores y una sal oxidativa o colorante redox (generalmente nitroazul de tetrazolio, NBT, por sus siglas en inglés nitro blue tetrazolium). Por ejemplo, la solución de tinción para el enzima Lactato

deshidrogenasa (Ldh) incluye al ácido láctico como sustrato, al nicotinamadenin dinucleótido (NAD) como cofactor y al metosulfato de fenazina (PMS) como catalizador intermediario. La posición a la que la LDH de tejido y organismo en estudio ha migrado en el gel se observa por medio de una reacción en la que el ácido láctico es oxidado a ácido pirúvico y la sal se reduce a un precipitado azul visible. Pueden encontrarse en el mercado protocolos y reactivos para más de 100 tinciones histoquímicas.

Varios amortiguadores iónicos son utilizados en la electroforesis de proteínas, y su función principal es compensar los cambios que se dan en el pH durante la electroforesis (el ánodo se vuelve ácido y el cátodo básico). Estos cambios están directamente relacionados con el tiempo de corrimiento, con el voltaje y la corriente que se generan durante la electroforesis. Los amortiguadores también forman una conexión iónica entre el campo eléctrico (electrodo) y el medio de suspensión (gel/acetato). Los amortiguadores reducen la interacción de grupos cargados en las proteínas con cualquier otro grupo cargado en la matriz que pueda modificar las cargas netas de las proteínas, además de que transportan catalizadores enzimáticos (por ejemplo, EDTA disódico) o proveen catalizadores enzimáticos (ejem. Mg^{2+}).

Los principales métodos electroforéticos son cuatro diferenciados en función de la naturaleza del medio de soporte: 1) gel de almidón, que separa con base al tamaño y a la carga. 2) Gel de poliacrilamida, permite la separación de proteínas también en base al tamaño y a la carga, aunque de manera más fina ya que la separación es

inversamente proporcional al peso molecular. 3) Gel de agarosa, que generalmente presenta una alta concentración de grupos ácidos (carboxilo y sulfato) y 4) acetatos de celulosa, que presenta varias ventajas en comparación con las anteriores (ej. repetitividad de experimentos, cantidades pequeñas de tejido y pocas cantidades de reactivos requeridas para su corrimiento). Sin embargo, solamente separan a las proteínas con base a su carga y no a su tamaño.

Los patrones de bandeo o zimogramas se interpretan en términos de genotipos mendelianos en loci particulares. Las bases mendelianas del polimorfismo observado pueden ser verificadas por medio de cruza biológicas experimentales o por medio de las consideraciones de la genética poblacional: comparando las frecuencias de los datos obtenidos con los esperados de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg para alelos neutrales [por ejemplo, para poblaciones con cruzamiento externo, y sin subdivisiones micro-espaciales, las frecuencias esperadas han mostrado encontrarse muy cercanas a las observadas ($p^2 + 2pq + q^2$)], se evidencia la naturaleza mendeliana de las variantes. Lo mismo puede conseguirse mediante la detección de la estructura cuaternaria de los enzimas.

Los alelos múltiples de las isoenzimas en cualquier locus se deben considerar como atributos cualitativos "multi-estado", cuyo orden filogenético no puede ser inferido por medio de la movilidad electroforética, por lo cual, los datos de isoenzimas normalmente consisten de la acumulación de información genotípica de un

determinado número de loci (que generalmente no se encuentran ligados y se distribuyen en el genoma nuclear). En conclusión, las premisas requeridas para la interpretación de bandas electroforéticas son: 1) que los cambios observados en la movilidad de las isoenzimas en los campos eléctricos reflejan cambios en la secuencia codificadora de DNA, por lo que las diferencias en los patrones de bandeo entre individuos se asumen como diferencias genéticas basadas en la herencia; 2) la expresión de las enzimas es codominante (se expresan ambos alelos en un locus) y cuando se utiliza la información alélica para aspectos de genética poblacional se trabaja bajo la premisa del principio del equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual asume que las frecuencias alélicas en una población con apareamiento al azar y en ausencia de selección, deriva génica y migración, se mantendrán en equilibrio ($p^2 + 2pq + q^2$) y 3) que los alelos alternativos en un locus dado se encuentran sometidos a la misma selección (son neutros).

El polimorfismo de proteínas en poblaciones naturales ha sido utilizado en la descripción de cambios en las frecuencias alélicas, tanto en el tiempo como en el espacio, con el fin de inferir eventos históricos que puedan haber tenido influencia significativa en la estructura genética de las poblaciones, como por ejemplo los cuellos de botella (Bonnell y Selander, 1974, *vide*: Hillis y Moritz, 1990). En estudios de entrecruzamiento, cruzamiento externo y dispersión, las isoenzimas han podido establecer relaciones genéticas y ecológicas para inferir aspectos específicos en la estructura poblacional, por ejemplo, estructura de apareamiento y flujo génico

efectivo (Loveless y Hamrick, 1984; Chepko-Sade y Halpin, 1987, *fide*: Hillis y Moritz 1990) y en estudios de relaciones filogenéticas y evolutivas.

Variación genética y estructura de poblaciones.

Los principios básicos de la genética de poblaciones se pueden resumir en dos, el primero que describe los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones, a través de las frecuencias alélicas y/o de los genotipos y el segundo que trata de determinar esta variación con relación a los procesos evolutivos (como la selección natural, la deriva génica, la mutación, la migración y los sistemas reproductivos). El primer principio se aborda a partir de la llamada Ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, la cual relaciona a las leyes de Mendel con el concepto de población y trata de predecir la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas en ausencia de cualquier proceso evolutivo, por lo que:

$$A = p^2 \quad ; \quad Aa = 2 pq \quad \text{y} \quad a = q^2$$

En donde **A** es la frecuencia genotípica de los homocigos **AA**, **Aa** la de los heterocigos y **a** la de los homocigos **aa**, **p** la frecuencia del alelo **A** y **q** la del alelo **a**, y además se espera que:

$$A + Aa + a = 1 \text{ y } p + q = 1.$$

La genética de poblaciones, por otro lado, se encarga de estudiar los efectos de las

diversas fuerzas evolutivas sobre la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg. A ello contribuyen Roland A. Fisher (1890-1962) quien realizó grandes aportaciones matemáticas a la teoría evolutiva, enfocadas principalmente a la selección natural; John B. S. Haldane (1892-1964), quien contribuyó tanto a la fisiología como a la bioquímica y genética, establece las bases centrales de la teoría neutral de la evolución de Kimura y fue el primero en analizar ejemplos clásicos dentro de la biología evolutiva (anemia falciforme). Sewall Wright (1889-1988), realizó grandes contribuciones, enfocadas principalmente a la endogamia y deriva génica. Motoo Kimura (1983), sugiere que la selección balanceadora de Dobzhansky no es suficiente para explicar la gran variación genética descrita por métodos moleculares, por lo que propone que la aparente tasa constante de sustitución molecular podría atribuirse a la interacción entre la deriva génica y la mutación, lo que se conoce como “teoría neutral de la evolución molecular” (*fide*: Crow y Kimura, 1970; *fide*: Eguiarte, 1990).

Estimación de la variación genética.

La variación genética es la base de la genética de poblaciones y para describir este “parámetro” se utiliza el **índice proporción de loci polimórficos (P)**, al cual Cavalli-Sforza y Bodmer (1971, *fide*: Hedrick, 1983) definen como “la ocurrencia en la misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con una frecuencia apreciable”, dicha estimación utiliza los criterios del 95% o del 99%, indicando que la frecuencia del alelo más común no excede esos niveles en la población y toma valores del entre 0 y 1, valores de cero indican la no-existencia de variación genética y cuanto más

cercanos a 1 indican que todos los genes/loci tiene 2 ó más formas alternativas o alelos. Este parámetro se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\bar{P} = \frac{X}{m}$$

donde X es el número de loci polimórficos en la muestra de m loci (Hedrick, 1983). Sin embargo, este índice presenta varios problemas: uno de ellos es que es muy sensible al número y tipo de enzimas que se utilizan, otro es la subjetividad en la utilización de los criterios del 95 y 99% y un tercero es el desconocimiento estadístico de la distribución de P (Ayala y Kieger, 1984). 2) El otro índice más utilizado es la **heterocigosis esperada promedio** o por individuo (H_E), la cual se obtiene a partir del promedio de la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para todos los genes estudiados en la población (Ayala y Kieger, *op. cit.*), por lo que para un locus dado se define como:

$$H_E = 1 - \sum f_1^2 + f_2^2 + f_3^2 \dots$$

En donde $f_1^2 \dots$ es el cuadrado de cada una de las frecuencias alélicas para ese locus. Este índice también toma valores de 0 cuando no se detecta variación en ninguno de los genes estudiados y 1 cuando todos los loci tienen un número grande de alelos y las frecuencias de estos alelos son iguales. Este índice a diferencia del P , es más confiable ya que es más robusto para el uso de distintos números y tipos de enzimas (Ayala y Kieger, 1984), sin embargo es sensible a tamaños de muestra pequeños.

Estimación de la estructura genética de poblaciones.

La descripción de la estructura genética de las poblaciones consiste en analizar las proporciones correspondientes a los distintos genotipos y su distribución en el espacio y tiempo de manera local o global (Eguiarte, 1990). Para llevar a cabo este análisis se utiliza el **índice de fijación (F)** propuesto por Wright en (1951, 1965) y su extensión para considerar la distribución geográfica de las poblaciones denominados **estadísticos- F de Wright** (Nei y Kumar, 2000). Al índice F se le define como sigue:

$$F = 1 - \left(\frac{\text{proporción heterocigos observados}}{\text{proporción heterocigos esperados } 2pq} \right)$$

en el caso de que sean solo dos alelos

Cuando los valores de F son iguales a 0, se dice que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que la heterocigosis observada y la esperada son iguales. Este parámetro puede tomar valores de -1 , cuando existen solamente individuos heterocigos en la población a $+1$, cuando sólo se presentan homocigos.

Los estadísticos- F de Wright (1943, 1951, 1965, 1978), por otro lado, funcionan como descriptores de la distribución de la variación genética en la estructura de poblaciones, así como también sugieren cuáles podrían ser las fuerzas evolutivas que están operando en una población dada (Clark y Hartl, 1989; Nei y Kumar, 2000), describiéndose bajo tres niveles de complejidad de la siguiente manera:

- a) La estimación de la **desviación local**, F_{is} (individuo-subpoblación) o **coeficiente de endogamia**, estima la reducción en la heterocigosidad en un individuo debida

a apareamiento no aleatorio entre las subpoblaciones. Este estimador toma valores de -1 a $+1$ y se expresa para alelos simples como sigue:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

Donde H_I es el promedio de heterócigos observados dentro de una subpoblación y H_S es la proporción de heterócigos esperados promedio de una subpoblación (Nei, 1987, *fide*: Nei y Kumar, 2000).

b) La estimación de la **diferenciación entre poblaciones**, F_{st} (subpoblación-población total), la cual es equivalente e idéntica para fines prácticos al índice G_{st} propuesto inicialmente por Nei (1973) y al actual estimador teta, θ_{st} de Cockerham (1963, 1973) y Weir y Cockerham (1984). Este índice estima la reducción de la heterocigosidad de una subpoblación debida a la deriva génica y toma valores entre 0 y 1, obteniéndose para alelos simples a partir de la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Donde H_S es la proporción de heterócigos promedio esperada a nivel subpoblación y H_T la proporción de heterócigos promedio esperada global (Nei y Kumar, 2000). Valores iguales a cero indican que la sub-poblaciones están en equilibrio de Hardy-

Weinberg, o sea con las mismas frecuencias alélicas, mientras que valores de 1 indican que son completamente diferentes entre sí, o sea que no comparten ningún alelo. Estos valores también se pueden interpretar en términos del porcentaje de variación genética dentro y entre poblaciones, es decir si el valor es de 0 indica que el total de la variación se encuentra en cualquier subpoblación (100% dentro y 0% entre), mientras que si es 1 indica que para tener variación se requiere tener a todas las distintas subpoblaciones, ya que cada una esta fija para un alelo dado (0% dentro y 100% entre) (Buckley *et al.*, 1988, *fide*: Eguiarte 1990). Esta diferenciación podría ser generada por deriva génica o por selección natural (Lewontin y Krakauer, 1973; Wright 1978, *fide*: Eguiarte 1990). Si la F_{st} es similar en todos los loci se considera que se debe a la deriva génica y cuanto mayor es el valor de este estimador se considera que ha habido mayor deriva génica y menor flujo génico, y por lo tanto mayor diferenciación y divergencia entre las distintas poblaciones (Wright, 1978; Saltkin, 1985b y 1989, *fide*: Eguiarte1990).

c) **La diferenciación total debida tanto a endogamia como a la deriva génica, F_{IT} (individuo-población total), se puede obtener para alelos simples a partir de la siguiente fórmula (Nei, 2000):**

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

Este estimador mide la reducción en heterocigosidad de un individuo con relación a la población total y también puede tomar valores entre -1 y $+1$.

La relación de los tres estadísticos- F puede definirse de la siguiente manera:

$$F_{IT} = F_{IS} + (1 - F_{IS}) F_{ST}$$

Donde F_{IT} es el resultado de la suma de F_{IS} más F_{ST} ponderada por F_{IS} (Wright, 1951, *fide*: Nei y Kumar, 2000).

La relación de los estadísticos- F con la descripción de la variación genética y las posibles fuerzas evolutivas que operan en una población dada se puede observar analizando por ejemplo: si se observa una F_{IS} positiva, sugiere que existe en la población un exceso de individuos homocigos con relación a los esperados de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg y que la endogamia ha sido posiblemente importante. Si la F_{IS} es negativa indica que existen menos homocigos que los esperados y sugiere que ha existido selección a favor de los heterocigos (Linhart *et al.*, 1981, *fide*: Eguiarte 1990). Si F_{ST} es pequeña indica poca diferenciación genética entre poblaciones, que la mayor parte de la variación se puede encontrar en una sola población y que se puede esperar que haya existido mucho flujo génico. Por el contrario, si las F_{ST} es alta para todos los loci sugiere mucha diferenciación genética entre sub-poblaciones, que la mayor parte de la variación genética se encuentra entre las sub-poblaciones y que posiblemente esto se haya generado por una alta

deriva génica. Si la F_{ST} es alta solo para algunos loci indica diferenciación genética solo en estos y posiblemente generada por adaptación a condiciones locales por selección natural (Slatkin, 1985b, *fide*: Eguiarte 1990).

Otro descriptor de la estructura genética es la **Identidad genética I** de Nei (1972, *fide*: Nei y Kumar, 2000), la cual se define como la similitud genética entre dos poblaciones y se expresa como sigue:

$$I_K = \frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum a_i^2 + b_i^2}}$$

Donde a y b son las poblaciones muestreadas; K es un locus dado; I_K es la similitud genética entre las poblaciones a y b en un locus dado y calcula la probabilidad de que dos alelos, uno tomado de cada población, sean idénticos; $a_i b_i$ representan los productos $a_1 b_1$, $a_2 b_2$, $a_3 b_3$; y $a_i^2 + b_i^2$ representa el cuadrado de las frecuencias de los alelos a^2_{i1} , a^2_{i2} , a^2_{i3} y b^2_{i1} , b^2_{i2} , b^2_{i3} . A partir de la identidad (I) se puede obtener la distancia genética D de Nei (1972), en donde el valor esperado es proporcional al tiempo evolutivo cuando se considera a la mutación y deriva génica (Nei y Kumar, 2000):

$$D = -\ln (I)$$

Estos estimadores se obtienen para pares de poblaciones o especies. La identidad I toma valores de 0 a 1. Valores de cero indican que las dos poblaciones no comparten ningún alelo y valores de 1 indican que las frecuencias alélicas de las dos poblaciones son idénticas. Mientras que si la distancia D tiene valores de cero, indica que las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick, 1985).

El estimador de distancias e identidades de coancestría de Reynolds *et al.*, (1983) por otro lado, se utiliza como base para estimar la distancia genética en poblaciones o especies en donde la evolución ha sido de corto-tiempo (short-time evolution) y cuando la divergencia entre las poblaciones y el ancestro común se debe solamente a deriva génica y se estima a partir del coeficiente de coancestría (θ) de Weir y Cockerham (1984):

$$\theta = 1 - \left[1 - \frac{1}{2N} \right]^t$$

Donde se asume que θ tiene una relación aproximadamente lineal con el tiempo, por lo que $\theta \approx t/2N$.

Filogenia molecular y evolución.

Dentro de la revolución de la filogenia molecular, las proteínas fueron las primeras moléculas utilizadas como marcadores filogenéticos. Hasta la fecha, la electroforesis

de proteínas sigue siendo uno de los métodos más populares para estimar relaciones evolutivas entre especies y otros taxa (Hillis y Moritz, 1990; Avise, 1994; Nei y Kumar, 2000). Sin embargo, es importante mencionar que los caracteres alozimáticos tienen las mismas limitaciones que otros tipos de datos sistemáticos. Por un lado, especies distintas morfológicamente pueden mostrar muy bajos niveles de divergencia y diferenciarse solamente por muy pocos caracteres filogenéticamente informativos aún cuando se analicen varios loci (Murphy *et al.*, 1983, *fide*: Hillis y Moritz 1990). Por otro lado, la divergencia alozimática puede proceder de un punto en donde se comparten muy pocos electromorfos, y los que se comparten pueden ser convergentes (Hillis y Moritz, 1990).

Sin embargo, existen grupos en los que la divergencia alozimática es suficientemente informativa en el análisis intra o inter-genérico (por ejemplo, las alozimas han sido utilizadas para investigar apropiadamente filogenias inter- e intra-genéricas en aves (Gutierrez *et al.*, 1983; Patton y Avise, 1983; Johnson *et al.*, 1988, *fide*: Hillis y Moritz, 1990). En estos casos el perfil alozimático ha resultado ser más informativos cuando a los loci individuales se le analiza como caracteres discretos.

La tasa de evolución es otro factor importante en los estudios de sistemática filogenética, principalmente cuando se pretende aplicar el reloj molecular o cuando se analizan tasas relativas entre diferentes tipos de datos (por ejemplo alozimas versus datos morfométricos). Por otro lado, se han generado comparaciones de relaciones creadas por los métodos que asumen tasas de evolución iguales (ej.

UPGMA) y los que no lo hacen (ej. árboles de distancia de Wagner) y estas revelan marcadas variaciones en las tasas de cambio entre los linajes (Hillis y Moritz, 1990). Por lo que se considera que la evidencia a partir de un reloj molecular alozimático es muy débil (Avice y Aquadro, 1982, *fide*: Hillis y Moritz 1990).

Recientemente se ha planteado que las hipótesis filogenéticas incluyen todas las conclusiones de la evolución comparativa (Harvey y Purvis, 1990, *fide*: Avice 1994). Por lo que, si se conocieran con certidumbre las filogenias de especies, nuestros conocimientos sobre la evolución de sus caracteres morfológicos, etológicos o de historias de vida podrían superponerse en los arboles filogenéticos y con esto tener una más amplia visión de lo que sería la evolución de las especies. Al mismo tiempo, se podría inferir la dirección de los cambios de cada característica del organismo. De este concepto ha surgido, a lo que Avice (1994) se refiere como “mapeo filogenético de caracteres”, que consiste en comparar caracteres particulares con especies asociadas en un cladograma, con el objetivo de conocer los patrones evolutivos de esos caracteres. Para ello, los cladogramas o filogenias con las que se está comparando, deben ser generados con datos independientes o diferentes a los de los caracteres que se están mapeando.

Bychowski y Cracraft (1993) mencionan que, con el desarrollo de la sistemática molecular desde la década y siglo pasados se han tenido nuevas expectativas a partir de datos moleculares utilizando a los genes como marcadores filogenéticos, especialmente en la secuenciación del ADN. Hasta la fecha dichos métodos siguen

siendo trascendentes para estimar relaciones evolutivas y filogenéticas entre especies y otros taxas morfológicamente iguales o similares. Se ha planteado que la mayor aportación de los datos moleculares en los estudios sistemáticos y filogenéticos es la posibilidad de tener un número ilimitado de variables, además de tener la libertad de seleccionar a los diferentes grupos de organismos como grupos externos (Pedroche, 1998). Así, los datos moleculares nos brindan otra alternativa: el examinar tasas de evolución cuando se pretende aplicar el reloj molecular o cuando se analizan tasas relativas entre diferentes tipos de datos. En este contexto, para estudios de estructura poblacional, hibridación, límites o fronteras entre especies o relaciones filogenéticas se podrían examinar árboles filogenéticos, para ser capaces de entender el origen evolutivo de las especies y proponer directamente una clasificación. Al mismo tiempo se podrían estimar los cambios de cada característica del organismo (Brooks y McLennan, 1984).

El genoma mitocondrial.

Se sabe que las mitocondrias son orgánulos subcelulares que se encuentran en animales eucariontes y que tienen la capacidad de reproducirse. Presentan ADN propio, no cromosómico, además de la maquinaria completa para la síntesis proteica, incluyendo sus propios ribosomas y componentes necesarios para la traducción y formación de proteínas funcionales (Sent y Calendar, 1986). La principal función de la mitocondria es regular las funciones de la célula a partir de la respiración y la fosforilación oxidativa, fenómeno en donde se produce el ATP necesario para el metabolismo celular (Antaramian, 1995). En general, en animales

el ADN es una molécula circular de doble cadena que contienen 13 marcos de lectura abiertos basándose en la comparación y secuencia de nucleótidos. El mapa genético lo conforman genes del citocromo b, citocromo c oxidasa subunidades I,II y III (COI-III), subunidad 6-8 (ATPasa 6 y ATPasa 8) y 7 como subunidades ND-1, 2, 3, 4L, 4, además del 5 y 6, 22 genes para el ARNt de transferencia y dos genes para ARN ribosomal (12S y 16S) (Anderson *et al.*, 1981). La evolución del ADN mitocondrial es dominada por mutaciones genéticas como: sustituciones o ganancia o pérdida de un par de nucleótidos, cambios que pasan a las generaciones sucesivas mediante el proceso de replicación. Las mutaciones ocurren al azar, ya que la naturaleza del estímulo ambiental que activa el cambio químico no determina el lugar o el sentido del cambio de la mutación; así las mutaciones resultan elementos transportables que constituyen una importante fuente de información acerca de las variaciones genéticas ocurridas en diferentes regiones del genoma de los organismos (Purdom, 1993).

OBJETIVOS

General.

Determinar el grado de variabilidad morfométrica, merística y molecular de algunas especies del género *Chirostoma* y utilizar dicha información para discutir aspectos relacionados con la historia evolutiva del mismo.

Específicos.

- a) Identificación de las especies de estudio por medio de la utilización de valores morfométricos y merísticos y de las claves tradicionales de Barbour (1973 a). Análisis de dichos datos por medio de técnicas univariadas y multivariadas con el fin de determinar caracteres que permitan fortalecer la separación morfométrica y/o merística de las especies.
- b) Determinación de la variación electroforética (proporción de loci polimórficos y heterocigosis esperada) de 13 especies y 3 subespecies del género *Chirostoma* de lagos y cuerpos de agua de la Mesa Central de México. Determinación de la variabilidad intra-específica de poblaciones de *C. grandocule* del Lago de Pátzcuaro por medio de datos morfométricos, merísticos y alozimáticos.
- c) Determinación de la secuencia nucleotídica de porciones de los genes mitocondriales citocromo b (~ 300 bp) y 16S ADNr (~600 bp) de varias de las especies de estudio e inferencia de relaciones filogenéticas preliminares.

MATERIALES Y METODOS

DESCRIPCIÓN MORFOMÉTRICA Y MERÍSTICA.

Recolecta de muestras.

Se recolectaron un total de 658 organismos de 16 sitios diferentes, los cuales fueron seleccionados, principalmente por presentar la mayor diversidad de especies. Los sitios fueron los siguientes: de las siguientes localidades del Lago de Chapala (1), Agua Caliente, Mismaloya, Tepehuaje y Petatán, además del Centro Acuícola de Tizapán, Jalisco; del Centro Acuícola de Zacapú, Michoacán (2); de las siguientes localidades del Lago de Pátzcuaro Michoacán (3), Ichupio, San Jerónimo, Janitzio y Ojo de Agua; del Lago de Zirahuén, Michoacán (4); del Lago de Cuitzeo, Michoacán (5) (Figura 1). El material biológico se obtuvo por medio de la captura comercial de los pescadores de las distintas regiones, utilizando redes charaleras, chinchorros y algunas con nasas. También se analizaron organismos colectados en los siguientes cuerpos de agua, Ignacio Allende, Guanajuato, Santiago Tilapa, Ignacio Ramírez y Cieneguillas (16), en el Estado de México, los cuales fueron donados por el Cand. a Doctor Joel Paulo Maya de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Una vez recolectados los organismos, se procedió a extraer el tejido hepático y una muestra de músculo, congelándose en N₂ líquido para su traslado al Laboratorio de Genética de la Planta Experimental de Producción Acuícola, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa para su procesamiento. Todos los

organismos se encuentran fijados y conservados en formaldehído al 4% en el laboratorio antes mencionado.

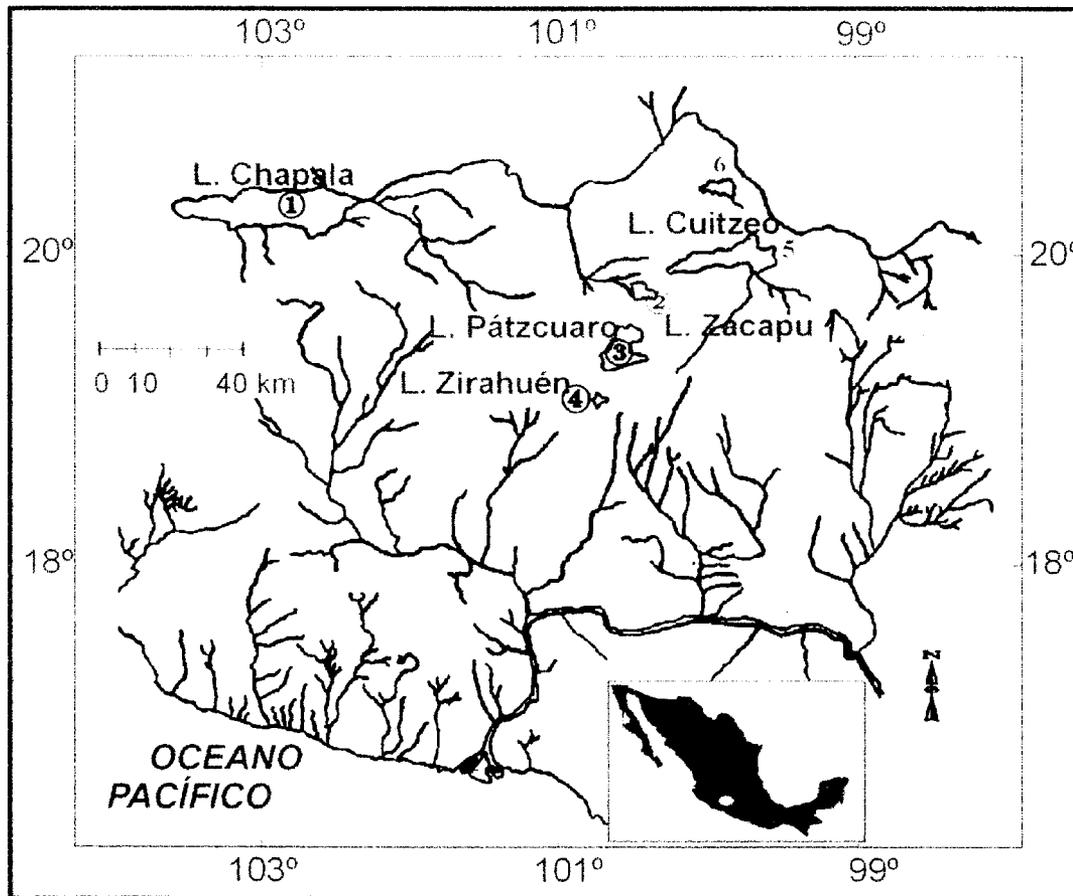


Figura 1. Mapa en donde se muestran los cuerpos de agua más importantes de donde provienen las muestras de *Chirostoma* del presente trabajo.

Identificación de Especies.

Se registraron 27 caracteres (variables) morfométricos para llevar a cabo la identificación de las especies. Veintitrés son las reportadas por Barbour (1973 a) y Barbour y Chernoff (1984), las otras cuatro variables registradas han sido consideradas en el presente trabajo como posiblemente informativas para la discriminación de las 16 especies (Mora-Souza, 1998 y Torres-Frías, 1998). De las 27 variables registradas, 19 son de tipo morfométrico (M) y ocho son de tipo merístico (m) (Figura 2). Los caracteres merísticos y morfométricos tienen una diferencia básica, debido a que los primeros son discretos y pueden asumir valores íntegros. En contraste, los segundos son continuos y asumen valores reales, lo que indica que su análisis estadístico debe hacerse por separado (Winans, 1987).

El estudio del grado de variabilidad en los caracteres morfométricos y merísticos entre las distintas especies se analizó con métodos multivariados, utilizándose de forma separada cada categoría de datos (M) y (m).

Análisis Morfométrico (M).

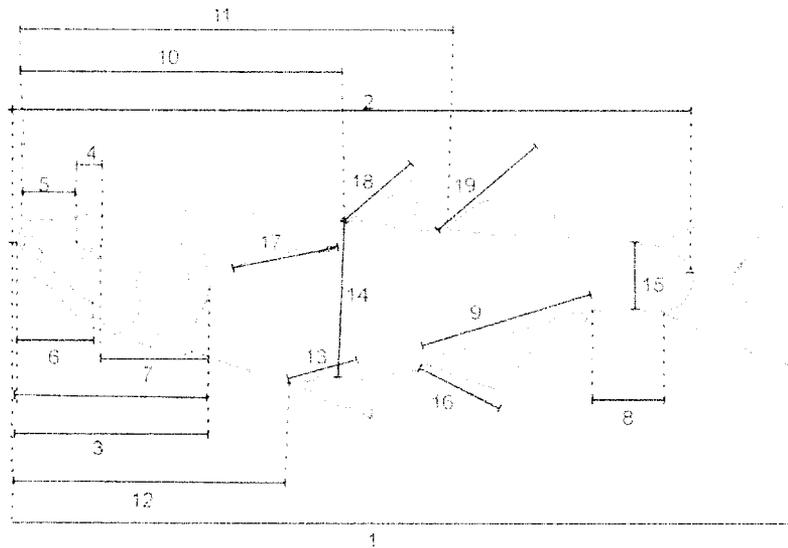
Para determinar el grado de variación morfológica entre los organismos colectados se analizaron las 19 variables morfométricas: longitud total (LT), longitud estándar (LS), longitud cabeza (LC), diámetro ojo (DO), longitud hocico (LH), longitud mandíbular (LM), longitud postorbital (LPo), longitud pedúnculo caudal (LpC), longitud base de la aleta anal (LBAa), distancia hocico a 1ª aleta dorsal (DH1D), distancia hocico a 2ª aleta dorsal (DH2D), distancia hocico a aleta pélvica (DHP),

longitud base aleta pélvica (LBAp), altura máxima del cuerpo (AmaxC), altura mínima pedúnculo caudal (AmpC), altura aleta anal (AAa), altura aleta pectoral (AAp), altura 1ª aleta dorsal (A1D) y altura 2ª aleta dorsal (A2D) (ver Figura 2).

Todos las medidas se efectuaron sobre el lado izquierdo de cada organismo, empleando un calibrador Vernier con 0.1 mm de precisión además de un ictiómetro. Para el análisis multivariado, las variables morfométricas se transformaron para eliminar las diferencias por tamaño de acuerdo a tres criterios: i) proporciones, representando a cada carácter con relación a la longitud total, ii) la transformación logarítmica de cada carácter, además de iii) la normalización de los datos de acuerdo a Lombarte y Leonart (1993). En este análisis también se incluyen los datos morfométricos originales (Mo).

Análisis merístico (m).

Las ocho variables merísticas registradas fueron: escamas línea lateral (ELI), escamas predorsales (EPD), escamas interdorsales (EID), rayos aleta pectoral (RAP), rayos 1ª dorsal (R1D), rayos 2ª dorsal (R2D), rayos anales (RAA), rayos aleta pectoral (RAP) y número de branquiespinas (BE) (ver Figura 2). Para el conteo de escamas y branquiespinas se utilizó un microscopio estereoscópico. En este caso, los datos que se analizan son los originales (mo) ya que dada su naturaleza, no requieren de modificación alguna.



Morfométricas:

- 1) Longitud total (LT)
- 2) Longitud estándar (LS)
- 3) Longitud cabeza (LC)
- 4) Diámetro ojo (DO)
- 5) Longitud hocico (LH)
- 6) Longitud mandíbular (LM)
- 7) Longitud postorbital (LPo)
- 8) Longitud pedúnculo caudal (LPc)
- 9) Longitud base aleta anal (LBAA)
- 10) Distancia hocico a 1ª dorsal (DH1D)
- 11) Distancia hocico a 2ª dorsal (DH2D)
- 12) Distancia hocico a aleta pélvica (DHP)
- 13) Longitud base aleta pélvica (LBAp)
- 14) Altura máxima cuerpo (AmaxC)

- 15) Altura mín. pedúnc. caudal (AmpC)
- 16) Altura aleta anal (AAa)
- 17) Altura aleta pectoral (AAp)
- 18) Altura 1ª dorsal (A1D)
- 19) Altura 2ª dorsal (A2D)

Merísticas:

- 1) Escamas línea laterall (ELI)
- 2) Escamas predorsales (EPD)
- 3) Escamas interdorsales (EID)
- 4) Rayos aleta pectoral (RAP)
- 5) Rayos 1ª dorsal (R1D)
- 6) Rayos 2ª dorsal (R2D)
- 7) Rayos aleta anal (RAA)
- 8) Branquiespinas (BE)

Figura 2. Medidas morfométricas y merísticas registradas en las muestras de *Chirostoma*.

Se aplicaron pruebas de normalidad y homoscedasticidad tanto a los datos morfométricos como a los merísticos, utilizándose las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett respectivamente ($\alpha=0.05$). Estos análisis tenían como finalidad observar si los datos presentaban una distribución de tipo normal y homogeneidad de varianzas y para poder aplicar (de ser posible) análisis estadísticos de tipo paramétrico. Las pruebas paramétricas utilizadas fueron el análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y el análisis multivariado.

Entre los diferentes tipos de análisis multivariado que se pueden llevar a cabo, en el presente trabajo se decidió trabajar con los métodos análisis de componentes principales (ACP), de correspondencia (CO) y análisis discriminante (AD). Dichos análisis se realizaron con tanto los datos morfométricos como con los merísticos.

En el presente trabajo para el ACP se determinó el número de componentes que eficientemente representan la información contenida en las variables por medio de la elaboración de una matriz de correlación lineal compuesta por cada par de variables (análisis de tipo R), utilizando el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson. Posteriormente, se encontraron los vectores característicos de la matriz de correlación que generan los ejes o componentes principales y las raíces características que representan la longitud de los ejes.

El AD se utilizó para identificar la mejor combinación de las variables y maximizar las diferencias entre especies por medio del cálculo de distancias generalizadas, ya que éstas eliminan los efectos de correlación entre los caracteres utilizados y explican las diferencias entre cada grupo con su centroide, es decir su dispersión (Libosvárky y Kux, 1982).

Para aplicar los métodos multivariados, y con el objeto de eliminar el efecto de la talla, en el caso de las medidas morfométricas los datos fueron transformados de acuerdo a tres criterios:

i) la transformación logarítmica de cada una de las medidas. Esta transformación está justificada por la existencia de relaciones potenciales $Y_{ij} = a_i Tl_j^{b_i}$ entre las variables, relaciones que se linearizan con la transformación logarítmica. Tl_j es la longitud total del organismo j ; Y_{ij} es la variable i del organismo j ; a_i y b_i los parámetros de las proporciones alométricas entre la LT y la variable i .

ii) La proporción de cada carácter con relación a la LT, e

iii) del filtrado o normalización de los individuos de cada especie de acuerdo a la ecuación de Lombarte y Leonart (1993) $Z_{ij} = Y_{ij} (X_o/Tl_j)^{b_i}$, donde Z_{ij} es el valor de cada variable después de la transformación (Y_{ij}), X_o representa al valor de referencia de la talla a la cual todos los organismos se redujeron o amplificaron en cada muestra, población o especie, por ejemplo en el caso del análisis de poblaciones de

la especie *C. grandocule*, para la muestra GJ-96 (Janitzio-1996) este valor fue de 76 mm y de 86 mm para la muestra GI-97 (Ichupio-1997), Tl_j es el valor de la LT de cada organismo analizado y bi es el parámetro de la proporción alométrica entre LT y la variable i . Los datos morfométricos originales (M o) y merísticos (m o) también fueron utilizados para el análisis.

Para ambos análisis (ACP y AD) se utilizó el programa de cómputo STATISTICA versión 4.5 (Statsoft Inc., 1993). Para el análisis CO se utilizó el programa Co603c de Leonart (1991).

ANÁLISIS MOLECULAR.

Alozimático.

En el presente trabajo se utilizaron corrimientos electroforéticos de alozimas en acetatos de nitrocelulosa para determinar la variación genética (*P* y *H*) de 13 especies y 3 subespecies de peces del género *Chirostoma* y de esta manera investigar si las frecuencias alélicas en estas especies se encontraban bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, además de ello, se pretende obtener estimadores de la estructura genética de poblaciones para la especie *C. grandocule*.

Colecta de tejido.

Se procedió a extraer en campo tejido muscular y de hígado de 481 organismos, los cuales corresponden a 26 muestras o poblaciones (de 13 especies y 3 subespecies). Las muestras se guardaron en tubos Eppendorf de 2.0 ml previamente etiquetados, los cuales inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido (N_2) para transportarse al Laboratorio de Genética de la Planta Experimental de Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Una vez en el laboratorio dichas muestras de tejido se transfirieron a un ultra congelador ($-80^{\circ}C$) para su almacenamiento y posterior procesamiento.

Extractos de proteínas y electroforésis en gel.

Se maceraron y homogeneizaron muestras de 0.1-0.2 g de tejido en 0.5-1.0 ml del amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 o NADP, pH 7.0, previamente enfriados. Las

muestras se centrifugaron a temperatura ambiente (TA) a 12,000 revoluciones por minuto (rpm), durante 2 minutos y se almacenaron a -20°C para su posterior utilización. Los extractos del tejido se utilizaron para hacer corrimientos electroforéticos horizontales sobre acetatos de celulosa (Titan III gels, Helen Laboratories) durante periodos de tiempo de 20-35 minutos a 220-350 voltios y a temperatura ambiente (TA). Se analizaron seis amortiguadores electroforéticos: Tris-EDTA borato, pH 8.5; Tris-citrato, pH 6.5; Tris-citrato, pH 8; Tris citrato-borato, pH 8.2; Tris-glicina, pH 8.5 y Acido citrico-morfolina (CAAMP), pH 7.0, y un total de 17 sistemas enzimáticos. Para los procedimientos de tinción de acetatos se siguieron los descritos por Hebert y Beaton (1989), con las modificaciones que se especifican en el Anexo 2 – Protocolo de tinción de acetatos *in extenso*.

A los loci de sistemas multilocus se les asignaron los números 1, 2, 3, etc., en el orden de mayor movilidad desde el cátodo. Se utiliza el mismo criterio para designar alelos múltiples entre cada loci, a, b, c, etc. La designación de alelos en este estudio no necesariamente corresponde con la de otros estudios, excepto a los de Barriga-Sosa *et al.*, (1998), Barriga-Sosa y Arredondo-Figueroa (1999) Barriga-Sosa (en prensa), Barriga-Sosa *et al.*, (2001 a), (2001 b) y Barriga-Sosa *et al.*, (en prep.) ya que los estudios previos han sido realizados con otros sistemas electroforéticos (geles horizontales de almidón, por ejemplo, en Echelle y Echelle, 1984).

Para cada locus analizado se estimaron las frecuencias alélicas, proporción de loci polimórficos con los criterios $P_{.95}$ y $P_{.99}$, número promedio de alelos por locus y

heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_o) para cada especie y muestra/población, empleando el programa GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995). La existencia de desviaciones en las proporciones esperadas por Hardy-Weinberg se analiza utilizando la prueba de exactitud de Fisher, GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995). También se utiliza la prueba de probabilidad combinada de Fisher (Sokal y Rohlf, 1995) para determinar la significancia de las diferencias en las frecuencias alélicas entre especies y poblaciones mediante el programa TFPGA 1.3 (Miller, 1998). La probabilidad de que los índices F de Weir y Cockerham (1984) asociados con cada locus y especie/población sea significativamente diferentes de cero también se determina con el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). Se utilizan los estimadores de los estadísticos- F de Weir y Cockerham (1984) para medir niveles preliminares en la estructura de poblaciones en algunas especies (TFPGA 1.3, Miller, 1998), estimándose los siguientes parámetros: f , la correlación de genes entre individuos y poblaciones, θ y θ_S , correlación de genes de diferentes individuos en la misma población y sub-población (en algunos casos). La estimación de la variación de estos parámetros se obtiene por medio de la utilización de un análisis jackknifing entre loci (Weir y Cockerham, 1984). Se realiza una prueba de 2000 replicas con cero permutaciones de alelos en las muestras (f) y alelos entre muestras (F , θ y θ_S) de todos los loci polimórficos para probar las diferencias en los estadísticos- F . Se estiman las relaciones genéticas entre pares de especies (o poblaciones) calculadas a partir de las frecuencias alélicas, utilizando el parámetro coeficiente de coancestría (Reynolds *et al.*, 1983) con el programa TFPGA. Para el

análisis de conglomerados se utilizó el método UPGMA (por sus siglas en inglés) en el programa TFPGA 1.3 (Miller, 1998). Utilizando el muestreo de bootstrap para los 8 loci polimórficos, se crea uno nuevo grupo de datos del mismo tamaño que el original, al analizar N caracteres de manera aleatoria y con reemplazamiento (quitando algunos y duplicando otros). Se utilizó el índice de consistencia (Felsenstein, 1985), el cual se calcula para cada nodo generado con los datos originales, este índice asume que cada locus representa una estimación independiente de la historia evolutiva de las especies analizadas, por lo que los nodos de árboles de UPGMA apoyados por loci múltiples se pueden interpretar como una mejor representación de grupos monofiléticos verdaderos (Miller, 1998).

También se generaron árboles filogenéticos con los métodos de Neighbor-joining y Máxima verosimilitud (ML) (Felsenstein, 1973) utilizando los coeficientes de distancia de Reynolds *et al.*, (1983) con el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1995). Este método estima filogenias asumiendo que todas las divergencias son debidas a deriva génica, en ausencia de nuevas mutaciones. La evaluación de ramas individuales en los árboles se realizó por medio de un bootstrap de los loci (porcentajes de bootstrap <70% se consideran como significantes y >50% como inexacto, Hillis y Bull, 1993).

Los genes mitocondriales citocromo b y 16s rADN.

En el presente trabajo se utilizaron fragmentos de los genes mitocondriales citocromo b (cit B) y 16S ADNr para inferir las relaciones filogenéticas preliminares de especies del género *Chirostoma*.

Extracción de ADN total (ADNt).

Se utilizó tejido muscular y hepático de 32 organismos colectados (2 muestras de cada especie y subespecie), almacenados a -80°C . Para la extracción del ADNt se utilizaron dos diferentes protocolos (de acuerdo a la disponibilidad de recursos y a la calidad del tejido):

- 1) El protocolo sugerido por Sambrook *et al.*, (1989) con las modificaciones de Barriga *et al.*, (1995), utiliza solventes orgánicos para extraer el ADN celular y consistió en cortar de 50 a $200\mu\text{l}$ de tejido muscular o hígado que se colocaron en microtubos Eppendorf de 1.5 ml. Al tejido se le agregó un volumen igual de proteinasa K disuelta en un amortiguador (100mM Tris HCl, pH 8.0, 40mM EDTA, 0.2% SDS, 200 $\mu\text{g/ml}$ proteinasa K) previamente calentado en un baño de temperatura constante a 60°C . Las mezclas se maceraron con un majador de tamaño Eppendorf y posteriormente se incubaron a 60°C por $3\frac{1}{2}$ a $4\frac{1}{2}$ hrs (para permitir el rompimiento del tejido). A continuación se agregó a la mezcla el equivalente a la mitad de su volumen de fenol neutro [TE (IXTE: 10mM Tris Cl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)] y se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm)

durante 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante a un nuevo tubo y se desechó la fase orgánica, procedimiento que se repitió varias veces hasta que la mezcla se vio clara y transparente o libre de proteínas contaminantes. El ADNt extraído se precipitó, añadiendo un volumen equivalente de ddH₂O y dos volúmenes de EtOH al 100% centrifugándose a 3500 rpm durante 30 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de ADNt se lavó una vez con EtOH al 75% con la finalidad de eliminar las sales que ayudan a acarrear los ácidos nucleicos. La pastilla de ADNt se deshidrató en un desecador con bomba de vacío durante 5 a 10 min y se resuspendió en 50-150µl de IX TE. Posteriormente se mezcló por aproximadamente 5 min y se almacenó a 4°C para su posterior procesamiento.

- 2) El método DNeasy™ (QIAGEN) utiliza a la enzima proteinasa K para la lisis del tejido y una membrana de sílica-gel para la purificación del ADN celular. El tejido se maceró ligeramente antes de someterlo a la lisis con la proteinasa K (1-3 hr) y posteriormente el ADN se adhirió selectivamente a la membrana de la columna del método DNeasy mientras que los contaminantes e inhibidores enzimáticos fueron lavados. Finalmente el ADNt se recupera, resuspendiéndose en ddH₂O.

Amplificación por PCR de los genes Citocromo b y 16S ADNr.

Para llevar a cabo las amplificaciones (PCR: Reacción en Cadena de la enzima Polimerasa), se siguió la técnica descrita por Barriga *et al.*, (1995) con las siguientes modificaciones: Los oligonucleótidos o cebadores universales empleados para

amplificar los genes citocromo b fueron: cyt B H15149 5'-CCC TCA GAA TGA TAT TTY TTC TCA-3' (cit B¹⁹³) y B-gludg-L L14720 5'-TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG-3' (cit B¹⁹⁵) (de 24 y 21 nucleótidos, respectivamente) (Palumbi *et al.*, 1991), estos cebadores contienen de 41.66 - 42.82% de GC. Los oligonucleótidos universales empleados para el gen 16S ADNr fueron: Sar L2150 5'-GCG CTG TTT ATC AAA AAC AT-3' (16^{Sar}) y Sbr H3080 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3' (16^{Srb}) de 20 y 22 nucleótidos, respectivamente y contienen de 30 - 50% de GC.

Se utilizaron las enzimas *Taq* DNA polimerasa (*Thermus aquaticus*) de Perkin Elmer^{MR} y *Taq* DNA polimerasa de QUIAGEN^{MR} siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Las condiciones de la reacción fueron: 2 µg tADN, 2.5 µl de 10XPCR amortiguador (100mM Tris HCl pH 8.3, 50M KCL, 0.01% w/x gelatina), X µl de ddH₂O, 0.5 µl de solución concentrada de 25mM MgCl, 0.5 µl de 10 mM dNTP's [dGTP, dATP, dCTP y dTTP], 5 µM de cada cebador (Citocromo b¹⁹³ y ¹⁹⁵ y/o 16S ADNr ^{Sar} y ^{Sbr}) 0.125 µl de *Taq* polimerasa para un volumen final de 25- 50 µl. Los ciclos termales de amplificación para ambos genes consistieron en: la desnaturalización de la doble cadena a 96°C durante 1:30 min, el reconocimiento y empalme de los oligonucleótidos a la cadena monocatenaria de ADN a 36°C durante 1:00 min, y la extensión de la cadena complementaria por medio de la *Taq* polimerasa a 72°C durante 1:30 min (1 ciclo). A continuación se aplican 30 ciclos con las siguientes modificaciones: 95°C/00:45 seg, 36°C/00:30 seg, 72°C/00:45 seg.

Los fragmentos amplificados se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Los geles se corrieron en el amortiguador 1X TAE (Tris base, ácido glacial acético y 0.5M EDTA, pH 8.0). Se utilizaron aproximadamente 2 µg del producto amplificado y 1µl de la solución de tinción de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% de cianol FF xileno y 15% de Ficoll). Los geles se sometieron a un potencial eléctrico de 65voltios/40mA durante 30-60 minutos. Posteriormente, el gel se sumergió en una solución de H₂O con 10 mg/ml de bromuro de etidio para visualizar los fragmentos o bandas de ADN generadas. Se compararon con el marcador molecular estándar λ ladder (2.5 ng), visualizándose en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) de 360nm. La foto-documentación del corrimiento se realizó por medio del sistema GELDOC programa 1000 (del Laboratorio de Fisiología Celular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa).

Para la purificación del ADN previo al análisis de su secuencia, se utilizaron los siguientes productos:

a) Kit USBIOCLEAN[®] basado en el método de Volgelstein y Gillespie (1979), el cual permite purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa, acrilamida o de reacciones de PCR. Utiliza una suspensión de fibra de vidrio a la cual se adhiere el ADN y garantiza una recuperación del 80% del producto purificado.

b) El juego de enzimas (Amersham Life Science), el cual utiliza las enzimas hidrolíticas exonucleasa I y la fosfatasa-alcalina de camarón para preparar los productos bicatenarios de PCR para la secuenciación. Ambas enzimas eliminan el exceso de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y de cebadores residuales por la amplificación vía PCR, que pueden interferir con los métodos normales de secuenciación (ya que estos métodos también hacen uso de cebadores y nucleótidos). La enzima exonucleasa I elimina residuos de cebadores o cualquier ADN monocatenario extraño producido por la PCR y la fosfatasa alcalina de camarón elimina residuos de dNTPs de la mezcla de PCR.

c) Las columnas QIAquick® de QUIAGEN, método que se basa en la utilización de concentraciones adecuadas de sales caotrópicas y un determinado pH (≤ 7.5) para la adsorción selectiva del 95% del ADN a la membrana de sílica gel de la columna. De esta forma se eliminan las enzimas utilizadas en los pasos antes mencionados.

Secuenciación Directa.

El análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados se determinó de manera directa, utilizando el método y juego de químicos de la compañía Perkin-Elmer (PRISM™) Dye terminator Cycle Sequencing Reaction Kit), siguiendo sus recomendaciones y los cebadores originales de amplificación (cit B^{193 - 195} y 16S^{Sar-Sbr}). Las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y fueron leídas de forma automática en un secuenciador ABI-373

(Applied Biosystems™). El proceso de secuenciación se llevó a cabo en la Universidad de California en Berkeley para el gen cit B y con la ayuda del Dr. Francisco F. Pedroche y a través de los servicios de Secuenciación de la misma universidad en Davis. Fragmentos previos de secuencias del gen cit B se obtuvieron con la colaboración del laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana y con el apoyo del Dr. Ramos Kuri. Los resultados obtenidos se analizaron a partir de los electroferogramas y de las secuencias en texto.

Las secuencias obtenidas para ambos genes se analizaron separadamente y de la siguiente manera:

- a) Se realizó un análisis de BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) para determinar la veracidad de las secuencias con relación a secuencias registradas en la base de datos Genbank de la NCIB (National Center for Biotechnology Information) y determinar la significancia del alineamiento.

- b) Las secuencias verificadas se alinearon en el programa ESEE version 2.0 (Cabot, 1992) con secuencias de referencia. Para ello el gen cit B se tradujo a amino ácidos utilizando el código genético del genoma mitocondrial para vertebrados (ATA = Met, TGA = Trp y AGA = Ser), utilizándose como referencia las secuencias parciales del mismo gen para los siguientes atheriniformes: *Atherinomorus ogilbyi* (número referencia, NR AF031130), *Atherinosoma*

microstoma (NR AF031132) y *Craterocephalus marjoriae* (NR AF031131). Para la porción del gen 16S ADNr se utilizó la secuencia de referencia del pez *Cyprinus carpio* (NR).

Las secuencias alineadas se sometieron a un Bootstrap con 1000 replicas y los resultados se analizaron con los siguientes métodos de distancia genética: 1) Jukes y Cantor (1969), que asume cambios independientes en todos los sitios con la misma probabilidad; 2) el modelo de 2-parametros de Kimura (1980), que permite detectar diferencias entre las tasas de transición (cambios de purinas a purinas o pirimidinas a pirimidinas) y tranversión. 3) El modelo DNAML (Felsenstein, 1995) que incorpora diferentes tasas de transición y tranversión así como diferencias en las frecuencias de los cuatro nucleótidos. Los análisis de distancia genética para nucleótidos se llevaron a cabo en el programa DNADist y DNANL, mientras que para analizar la secuencia de amino ácidos del fragmento del gen cit B, se utilizó el programa ProtDist todos ello incluidos en el paquete PHYLIP (Phylogeny Inference Package, versión 3.57c) (Felsenstein, 1995).

Las filogenias se infirieron por medio de los siguientes análisis:

- 1) Parsimonia de ADN (Felsenstein, 1995) el cual genera un árbol sin raíz y utiliza el método de Fitch (1971) para calcular el número de cambios de bases necesarios para un determinado árbol. Asume que cada sitio y linaje evolucionan de manera independiente y que la probabilidad de la sustitución de una base en un sitio determinado es pequeña con relación a la longitud en tiempo de las ramas de la

filogenia. Este modelo también asume que la cantidad de cambios esperados en las diferentes ramas de la filogenia no varía mucho, por lo que dos cambios en una rama con altas tasas son más probables que un cambio en una rama con bajas tasas de cambio. Por otra parte la cantidad de cambios no varía tanto entre sitios como para que dos cambios en un sitio sean más probables que un cambio en otro.

- 2) El método de Neighbor-Joining (Felsenstein, 1995), que construye árboles por medio de la agrupación de linajes, utilizando tanto la longitud de las ramas como la unión de éstos. Estos árboles no tienen raíz puesto que no asumen un reloj evolutivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESCRIPCIÓN MORFOMÉTRICA Y MERÍSTICA.

De entre los 658 organismos colectados, se identificaron 13 especies y 3 subespecies del género *Chirostoma* de acuerdo a sus caracteres morfométricos y merísticos. Doce especies pertenecen al grupo Jordani y solamente cuatro al grupo Arge (de acuerdo a Barbour, 1973 a). En la Tabla 2 se muestra el número de especies identificadas, el grupo al que pertenecen, número de organismos por especie además del sitio y las fechas de colecta. Es importante mencionar que algunas de las especies colectadas fueron encontradas en sitios no registrados previamente: por ejemplo, individuos de las especies *C. estor* (14 ejemplares) y *C. copandaro* (5 ejemplares) fueron colectados como juveniles en el Lago de Chapala. Por otro lado, de acuerdo a los datos reportados previamente por otros autores, ejemplares de *C. lucius* fueron capturados en el lago de Pátzcuaro (7 organismos) y en la Laguna de Zacapú (3 ejemplares). La especie *C. humboldtianum* se encontró en los lagos de Pátzcuaro (48 organismos), Chapala (6 organismos) y Zirahuén (29 organismos), además de la laguna de Zacapú, Michoacán. La identificación de estas especies fue verificada por el Candidato a Doctor Joel Paulo Maya del laboratorio de Ictiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN).

Tabla 2. Especies de *Chirostoma* analizadas y sitios de colecta. Tamaño de muestra por sitio de colecta y utilizado en los análisis del presente trabajo (Ng = análisis genético; Nm= análisis morfológico, Nt= tamaño total de muestra), y fecha de colecta.

Especies				Especies			
Localidad (sitio de colecta)	Ng	Nm	Fecha	Localidad (sitio de colecta)	Ng	Nm	Fecha
Grupo Jordani							
<i>C. jordani</i>							
<i>C. consocium</i>				Lago de Cuitzeo	15	34	06-1996
Tepehuaje, Lago de Chapala	10	10	06-1996	Presa Ignacio Allende, Gto.	5	5	06-1997
Mismaloya, Lago de Chapala	5	47	08-1996	<i>C. lucius</i>			
Agua Caliente, Lago de Chapala	5	35	08-1996	Tepehuaje, Lago de Chapala	4	4	08-1997
<i>C. consocium reseratum</i>							
Tepehuaje, Lago de Chapala	2	2	04-1997	Petatán, Lago de Chapala	5	5	08-1996
Mismaloya, Lago de Chapala	4	8	04-1997	Ctro. Acuícola de Zacapú	3	3	08-1996
Agua Caliente, Lago de Chapala	2	2	04-1997	San Jerónimo, Lago de Pátzcuaro	4	7	04-1997
<i>C. chapalae</i>							
Tepehuaje, Lago de Chapala	--	2	04-1997	Lago de Zirahuén	1	1	06-1996
				Janitzio, Lago de Pátzcuaro	2	2	05-1997

Continúa Tabla 2.

		8	15	04-1997	C. promelas				
Mismaloya, Lago de Chapala		8	15	04-1997					
Agua Caliente, Lago de Chapala		8	36	04-1997	Tepehuaje, Lago de Chapala	5	5	08-1996	
C. estor					Ctro. Acuíc. Tizapán, Chapala	6	6	04-1997	
Petatán, Lago de Chapala		2	2	08-1996	Agua Caliente, Lago de Chapala	1	1	08-1996	
Mismaloya, Lago de Chapala		3	3	08-1996	C. sphyraena				
Tepehuaje, Lago de Chapala		6	9	04-1997	Petatán, Lago de Chapala	3	10	08-1996	
Ojo de Agua, Lago de Pátzcuaro		4	4	04-1997	Tepehuaje, Lago de Chapala	1	1	08-1996	
San Jerónimo, Lago de Pátzcuaro		17	21	08-1996	Centro Acuíc. Tizapán, Chapala	1	1	08-1996	
C. estor copandaro					Grupo Arge				
Tepehuaje, Lago de Chapala		4	4	08-1996	C. attenuatum				
Ctro, Acuíc. Tizapán, Lago Chapala		--	1	08-1996	Janitzio, Lago de Pátzcuaro	17	17	06-1996	
Ichupio, Lago de Pátzcuaro		6	8	04-1997	C. attenuatum zirahuen				
					Lago de Zirahuén	20	37	05-1997	

Continúa Tabla 2..

<i>C. grandocule</i>		<i>C. labarcae</i>					
Janitzio, Lago de Pátzcuaro	96	99	06-1996	Tepehuaje, Lago de Chapala	3	5	04-1997
Janitzio, Lago de Pátzcuaro	87	--	09-1999	<i>C. riojai</i>			
Ichupio, Lago de Pátzcuaro	99	106	05-1997	Laguna Sant. Tilapa, Edo. México	5	5	06-1997
<i>C. humboldtianum</i>				Presa Ig. Ramírez, Edo. México	7	2	06-1997
Petatán, Lago de Chapala	2	2	08-1996	Cieneguillas, Edo. de México	3	3	06-1997
Tepehuaje, Lago de Chapala	4	4	08-1996				
Laguna de Zacapú	6	6	09-1996				
Lago de Zirahuén	18	29	05-1997				
Lago de Pátzcuaro	20	48	08-1999				
							Nt = 528 658

A continuación se presenta la descripción de las 13 especies y 3 subespecies resultado de este trabajo. Los valores mínimos y máximos de los caracteres determinantes en la identificación de cada una de las especies analizadas se comparan con los reportados por Barbour (1973 a) y se discuten las diferencias.

Grupo Jordani (Barbour, 1973a).

***Chirostoma consocium* (Jordan y Hubbs, 1919).**

Nombre común: Charal de aleta larga, Longfin silverside (Mayden *et al.*, 1992)

Son organismos cuya mandíbula inferior se proyecta un poco y presenta dientes pequeños (Figura 3). Las escamas de la línea lateral tienen canales. La especie presentó valores similares a los intervalos de *C. chapalae*. Sin embargo el número de escamas predorsales fue más alto (43-73 contra 29-61), lo que permitió diferenciarla de la anterior. Presentó de 52-72 escamas de la serie longitudinal, 20-26 branquiespinas y las siguientes distancias como porcentajes de la longitud patrón: del hocico a la segunda aleta dorsal 68.22-68.9, longitud cefálica 20.7-31.9, longitud del hocico 7-11.5 y altura mínima 8.6-9.3. Estos intervalos fueron similares a los reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 3). La dificultad para distinguir a ésta especie de *C. chapalae* ya ha sido anteriormente tanto a nivel alozimático (Echelle y Echelle, 1984) como morfométrico, con la utilización del aparato mandíbular de ambos taxa (Enriquez y Paulo-Maya, 1997; Paulo-Maya, 2000). Dicho aparato mandíbular es utilizado actualmente como carácter determinante en otras especies del género.

Tabla 3. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. consocium*.

Caracteres	1 (N = 92)	2 (N* = 145)
Escamas serie longitudinal	52-72 (60.4)	52-68 (N.D)
Escamas predorsales	43-73 (53)	43-79 (N.D)
Branquiespinas	20-26 (23)	24-29 (N.D)
Hocico a 2da aleta dorsal*	68-68.9 (67.3)	63.4-66.7 (N.D)
Longitud cefálica*	20.7-32 (25.8)	24.4-28 (N.D)
Longitud del hocico*	7-11.5 (8.8)	7.2-9.5 (N.D)
Altura mínima*	8.6-9.3 (9.7)	8.2-9.8 (N.D)

1= presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.

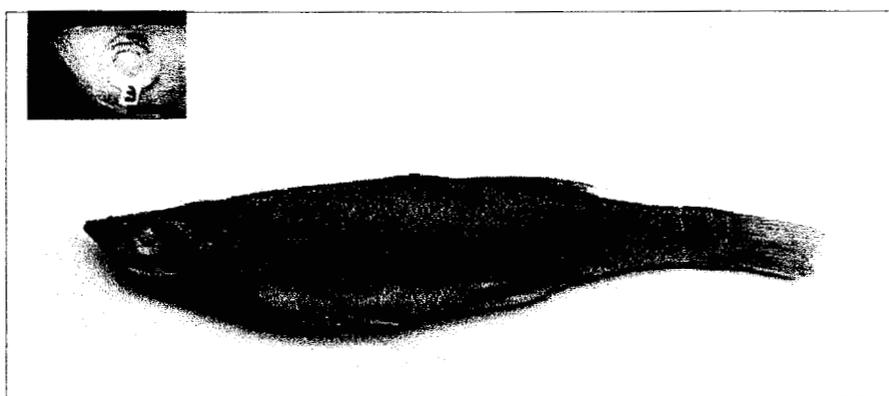


Figura 3. Fotografía de *C. consocium*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma consocium reseratum* (Álvarez, 1963).**

Nombre común: no presenta

Presentan dientes pequeños y en bandas. Morfológicamente, la especie (Figura 4) se traslapa con *C. consocium* y con *C. humboldtianum*, lo que dificultó su separación. Sin embargo, se diferenció de la especie nominal por presentar menor número de escamas predorsales (37-54 contra 43-73) y base de la aleta anal más corta (14-22 contra 13-26). En relación con *C. humboldtianum* presentó menor número de branquiespinas (15-26 contra 19-32) y distancia menor del hocico al origen de la aleta pélvica (20-44.4 contra 46-64.9) en porcentaje de la longitud patrón; longitud postorbital más corta (7-11 contra 8-27 mm), hocico más corto (5-9 contra 6-22 mm) y base de la aleta anal más corta (14-22 contra 14-44 mm). Los intervalos tanto merísticos como morfométricos se encuentran dentro de los reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 4), excepto, la longitud de la base de la aleta anal.

Tabla 4. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. c. reseratum*.

Caracteres	1 (N = 12)	2 (N* = 172)
Escamas predorsales	37-54 (43.3)	33-56 (42.4)
Rayos aleta anal	19-22 (20.9)	16-21 (18.0)
Longitud base aleta anal*	14-22 (17.08)	20.2-30 (21.4)

1= presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *= expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.

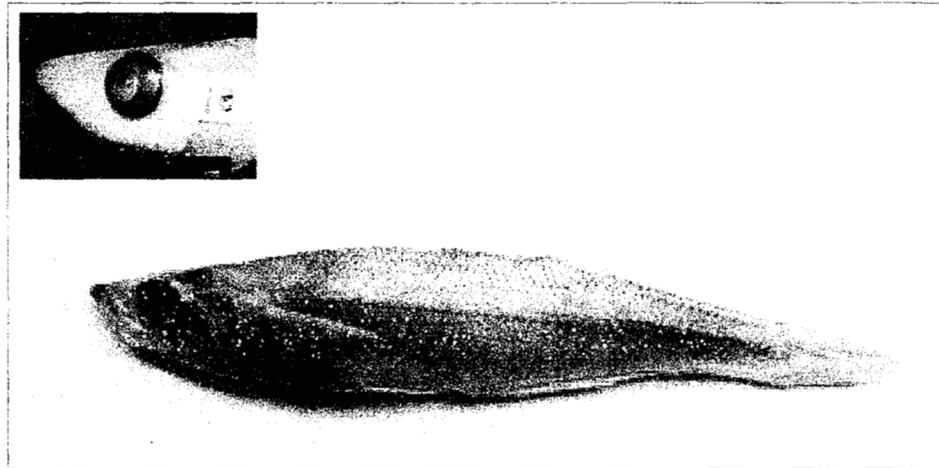


Figura 4. Fotografía de *C. c. reseratum*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma chapalae* (Jordan y Snyder, 1899).**

Nombre común: Charal de Chapala, Smallmouth silverside (Mayden, *et al.* 1992)

Presentó las escamas de la serie longitudinal con canales. La especie (Figura 5) presentó intervalos similares a los de *C. consocium*. Sin embargo se diferencio de ella por presentar promedios más bajos en: número de escamas predorsales (29-61, \bar{x} =41.4 contra 43-73, \bar{x} =53), longitud mandíbular (6-10, \bar{x} =6.9 contra 6-12, \bar{x} =7.84), pedúnculo caudal más angosto (5-9, \bar{x} = 6.34 contra 5-10, \bar{x} =6.9) y cabeza más corta (11-29, \bar{x} =16.2 contra 14-28, \bar{x} =18.4). Tanto los valores merísticos como los morfométricos de la especie se encontraron fuera de los intervalos reportados Barbour (1973 a) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. chapalae*.

Caracteres	1 (N = 53)	2 (N* = 86)
Escamas serie longitudinal	45-66 (55.2)	44-55 (49.7)
Escamas predorsales	29-61 (41.4)	29-49 (37.1)
Branquiespinas	20-25 (22.3)	25-29 (36.9)
Longitud cefálica*	18-31.8 (24.8)	23.8-25.5 (24.5)
Longitud mandibular*	9.5-12.5 (10.6)	8.6-9.4 (8.9)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible

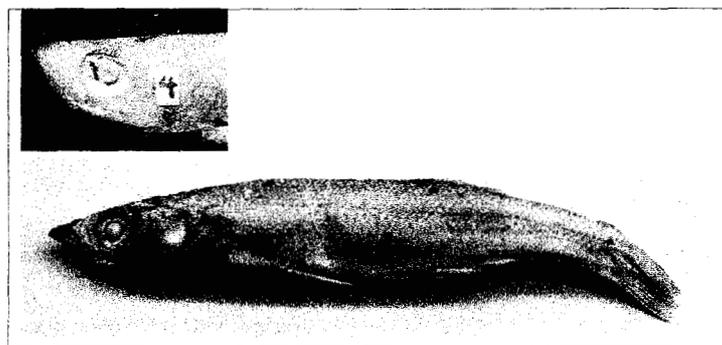


Figura 5. Fotografía de *C. chapalae*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

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

Nombre común: Pez blanco, Pike silverside (Mayden, *et al.* 1992), Kurucha urapiti (P'urhépecha, Chacón *et al.*, 1991)

La especie ha sido descrita como *Lethostole estor* (Jordan y Evermann, 1896-1900:792, *fide*: Barbour, 1973a), *Atherinichthys albus* (Steindachner, 1849:148, *fide*: Barbour, 1973a), *Chirostoma album* (Jordan y Zinder, 1899:146, *fide* Barbour, 1973a), *Chirostoma estor* var. *pacanda* por De Buen (1940a: 306), *Chirostoma estor* var. *tecuena* (De Buen, 1940a: 306). En el presente trabajo, fueron los organismos con mayor longitud patrón (273 mm). Tienen una cabeza grande, triangular y la mandíbula inferior se proyecta dejando ver los pequeños dientes de la porción anterior de la mandíbula (Figura 6). Presentó de 50-90 escamas predorsales, 20-28 branquiespinas y los siguientes valores como porcentajes de la longitud patrón: distancia hocico a 1ª aleta dorsal de 52.2-60.4, distancia hocico al origen de pélvica 41.4-50.5, distancia postorbital de 11.3-14.9, hocico 9.6-12.7, altura mínima 9.6-7.2 y longitud base aleta anal de 17.9-22.9. Los intervalos en general se encontraron dentro de los mínimos reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 6).

225709

Tabla 6. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. estor*.

Caracteres	1 (N = 39)	2 (N* = 210)
Escamas predorsales	50-90 (62.8)	56-108 (49.3)
Branquiespinas	20-28 (23.9)	23-28 (25.2)
Hocico a 1ª aleta dorsal*	52-60.4 (55.2)	64.1-67.8 (53.8)
Distancia hocico a origen pélvica*	41-50.5 (46.8)	44.1-51.3 (N.D)
Distancia postorbital*	11.3-14.9 (13)	13.6-16.2 (N.D)
Longitud del hocico*	9.6-13 (10.5)	10.5-12.3 (11.4)
Altura mínima*	7.2-9.6 (8.1)	7.3-8.2 (N.D)
Longitud base aleta anal*	17.9-22.9 (14)	16.1-21 (N.D)

1= presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *= expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.

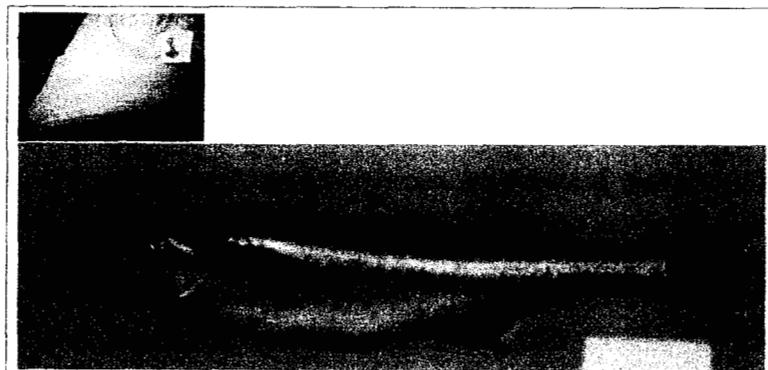


Figura 6. Fotografía de *C. estor*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma estor copandaro* (De Buen, 1945).**

Nombre común: no presenta

La especie fue reconocida como *C. estor pacanda* por Álvarez (1970:124) y tiene alta similitud morfológica (Figura 7) con *C. estor* pero en el presente trabajo mostró intervalos mínimos y máximos menores que la especie nominal en los siguientes caracteres (como porcentajes de la longitud patrón): longitud mandíbula (11.7-13.2 contra 12.2-15.3), distancia hocico a 1a aleta dorsal (53-60 contra 52.2-60.4), menor número de escamas en serie longitudinal (51-73 contra 55-74) y mayor número de escamas predorsales (54-75 contra 50-90). Aunque a esta especie se le considera como endémica del Lago de Zirahuén, los organismos del presente trabajo fueron colectados en los lagos de Chapala y Pátzcuaro.

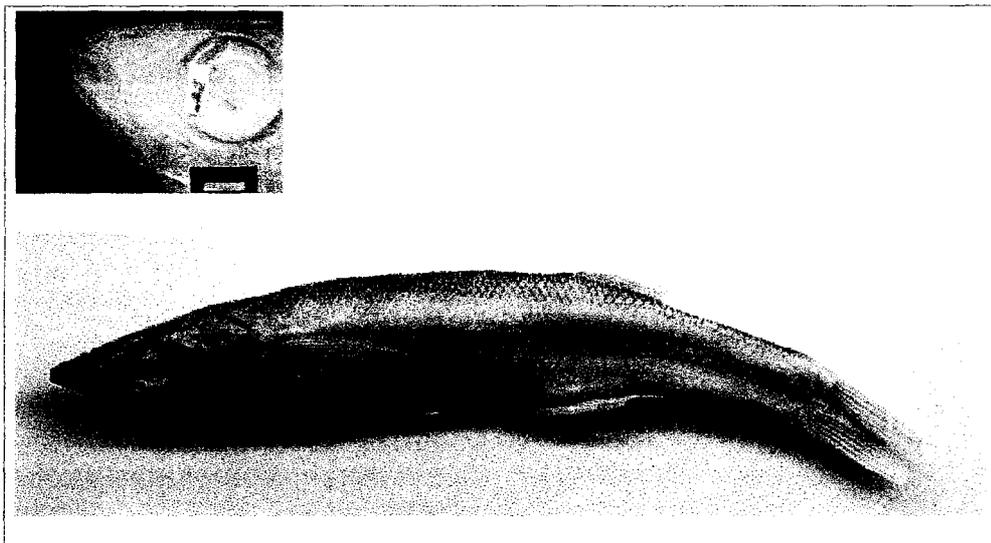


Figura 7. Fotografía de *C. e. copandaro*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma grandocule* (Steindachner, 1894).**

Nombre común: "Charal blanco" de Pátzcuaro (Solórzano, 1962), Chakuami (P'urhépecha, Chacón *et al.*, 1991), Charal ojo grande, bigeye silverside (Mayden, *et al.* 1992)

Descrito por primera vez por Steindachner (1894, *fide*: Barbour, 1973a) como *Atherinichthys grandoculis* (De Buen, 1945), es endémico del Lago de Pátzcuaro.

De los caracteres observados en esta especie (Figura 8) sobresale el número de branquiespinas, ya que es el valor más alto dentro del género (28-33, $\bar{x}=29.19$) característica que ha sido reportada para la especie desde sus primeras descripciones. Presenta los siguientes intervalos en caracteres merísticos: escamas serie longitudinal 52-69, escamas predorsales 29-62, rayos de la aleta anal 18-22 y los siguientes rangos en caracteres morfométricos expresados como porcentajes de longitud patrón: altura mínima 5-7.5, altura segunda dorsal 15.8-16.2, altura aleta anal 16.6-19.1, longitud cefálica 21.4-33.9, longitud mandibular 8.66-11.9 y distancia del hocico a 1ª aleta dorsal 44.23-59.33. Las diferencias entre los valores estimados como porcentajes de la longitud patrón en el presente estudio y lo reportado por Barbour (1973 a) (Tabla 7), se deben principalmente a las diferencias en la LS promedio.

Tabla 7. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. grandocule*.

Caracteres	1 (N = 205)	2 (N* = 190)
Escamas serie longitudinal	52-69 (59.8)	58-77 (66.5)
Branquiespinas	28-33 (29.4)	28-34 (31.5)
Rayos aleta anal	18-22 (21.0)	18-22 (19.8)
Altura mínima*	5-7.5 (8.6)	7.3-8.1 (N.D)
Altura 2da aleta dorsal*	15.8-16 (16.2)	13.3-14.8 (N.D)
Altura aleta anal*	16.6-19 (17.4)	13.8-16.2 (14.8)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón.

Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.



Figura 8. Fotografía de *C. grandocule*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

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

Nombre común: Charal de Xochimilco (Martín del Campo, 1955), Charal de aleta corta, Shortfin silverside (Mayden, *et al.* 1992)

Inicialmente descrita como *Atherina vomerina* (Valenciennes, 1835:481, *fide*: Barbour, 1973^a), *Atherinichthys humboldtii* (Gunther, 1861:404, *fide*: Barbour, 1973 a), *Atherina fontialis* (Cházaro, 1884:80), *Chirostoma regani* (Jordan y Hubbs, 1919), *Chirostoma bartoni* (De Buen, 1943:214), *Chirostoma bartoni bartoni* (De Buen, 1941c:7), *Chirostoma breve* (Regan, 1906-1908:51), *Eslopsarum regani* (De Buen, 1945:509), *Chirostoma ocampoi* (Álvarez, 1963a:197). La especie tiene un hocico subtriangular con la mandíbula inferior ligeramente proyectada (Figura 9), poseen dientes pequeños, en bandas y ocasionalmente presentan dos o tres en el vómer. Presentó escamas de la serie longitudinal 42-78, predorsales 25-55, branquiespinas 19-28 y los siguientes valores como porcentajes de longitud patrón: distancia hocico al origen pélvicas de 38.7-49.13, longitud postorbital 9.52-13.71, hocico 7.0-11.25 y base aleta anal de 9.3-19.0. Los intervalos merísticos con excepción de las escamas predorsales se encuentran dentro de los reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. humboldtianum*.

Caracteres	1 (N = 89)	2 (N* = 972)
Escamas serie longitudinal	42-78 (63.2)	43-73 (59.7)
Escamas predorsales	25-75 (47.13)	25-40 (36.7)
Branquiespinas	19-32 (24.3)	19-28 (23)
Distancia hocico a pélvicas*	38.7-49 (43.7)	40.9-51.2 (44)
Longitud postorbital*	9.5-13.7 (11.6)	12.2-16.8 (13.8)
Longitud hocico*	7-11.2 (8.9)	8.4-13.4 (10)
Longitud base aleta anal*	9.3-19 (14.8)	17.1-22.2 (19.4)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.

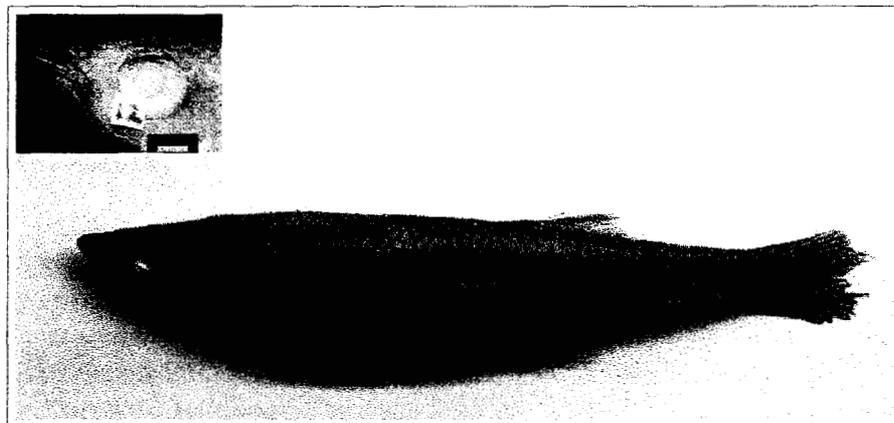


Figura 9. Fotografía de *C. humboldtianum*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma jordani* (Woolmanm, 1894).**

Nombre común: Yacapitzahuac (Martín del Campo 1955), "Mesa silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Descrito por primera vez como *C. brasiliensis* por Jordan (1879:299, *fide*: Barbour, 1973a). Presenta una serie de escamas en la línea lateral con poros o canales predominando los poros (Figura 10); las escamas de las partes laterales del cuerpo con bordes completos. El hocico es pequeño, oblicuo (Figura 10), presenta los dientes en una o dos hileras o en una banda angosta de los premaxilares y en dos hileras o en una banda amplia en los dentarios y están ausentes en el vómer y los palatinos. De las especies analizadas, ésta fue la que presentó el menor número de escamas de la serie longitudinal 34-41, predorsales 17-24 y branquiespinas (18-20, \bar{x} =19.1). Además destacan los siguientes valores expresados como porcentaje de la longitud patrón: hocico de 5.6-9.52, longitud pedúnculo caudal 18.18-26.92, altura segunda dorsal 14.3-19.6, base aleta anal 13.3-22.2. Tanto los valores descriptivos merísticos y morfométricos (expresados como porcentaje de la longitud patrón) se encontraron dentro de los rangos reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 9). Los organismos se encontraron en el Lago de Cuitzeo, Michoacán y en la Presa Ignacio Allende, en Guanajuato.

Tabla 9. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. jordani*.

Caracteres	1 (N = 39)	2 (N* = 2708)
Escamas serie longitudinal	34-41 (38.3)	36-48 (40.3)
Branquiespinas	18-20 (19.1)	14-22 (18.7)
Longitud hocico*	5.6-9.52 (7.4)	4.8-9.8 (N. D)
Longitud pedúnculo caudal*	18.2-26.9 (22)	18.6-26.2 (N. D)
Altura 2da. dorsal*	14.3-19.6 (19)	13.4-22.2 (18.3)
Longitud base aleta anal*	13.3-22 (18.9)	18-32.4 (N. D)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible

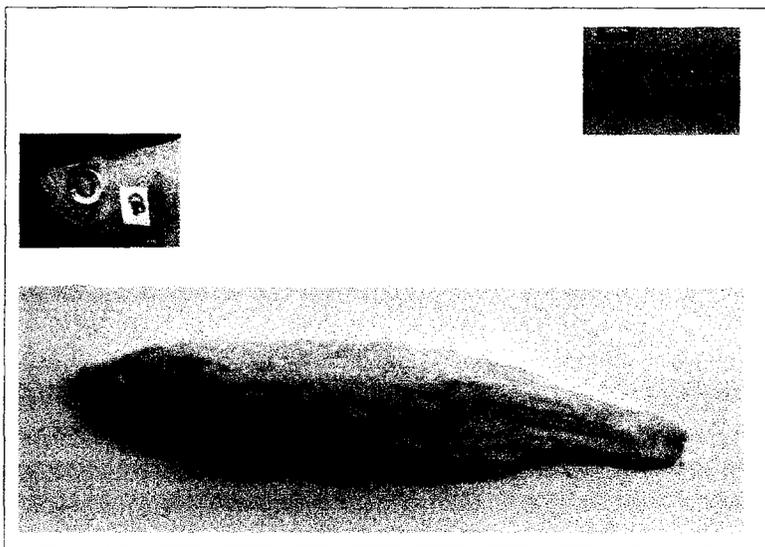


Figura 10. Fotografía de *C. jordani*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza y en la superior derecha detalle de las escamas de la línea lateral.

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

Nombre común: Charal de la laguna, "Longjaw silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Reconocido como sinonimia de *C. ocotlanae* (Jordan y Snyder 1899, *fide*: Barbour, 1973a) ya que no se han encontrado caracteres que los puedan diferenciar. Se caracteriza por presentar una mandíbula inferior más proyectada que la superior (Figura 11). Presentó los siguientes valores merísticos: escamas predorsales 50-104 y escamas interdorsales 8-16 y los siguientes valores como porcentaje de la longitud patrón: hocico 8.6-11.8, mandíbula 8.3-15.3 y una altura mínima de 6.53-8.16. Estos valores se encuentran dentro de los intervalos reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 10). La especie presentó valores muy similares a los obtenidos para *C. sphyraena* pero se diferenció de ésta por presentar menor número de escamas interdorsales (8-16 contra 13-19) y mayor altura de la segunda aleta dorsal (como porcentaje de la longitud patrón, 11.2-11.4 contra 15.8-16.5). La especie además de colectarse en el Lago de Chapala también fue encontrada en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán y en el Centro Acuícola de Zacapú, Michoacán. Se encontró en densidades bajas en los lagos de Chapala y Pátzcuaro.

Tabla 10. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. lucius*.

Caracteres	1 (N = 19)	2 (N* = 75)
Escamas predorsales	50-104 (72.16)	20-117 (N. D)
Escamas interdorsales	8-16 (12.37)	6-17 (N. D)
Longitud hocico*	8.6-11.8 (10.3)	10.5-12.5 (N. D)
Longitud mandíbula*	8.3-15.3 (12.9)	13.1-17.9 (N. D)
Altura mínima*	6.53-8.16 (8.0)	8.3-9.2 (N. D)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible

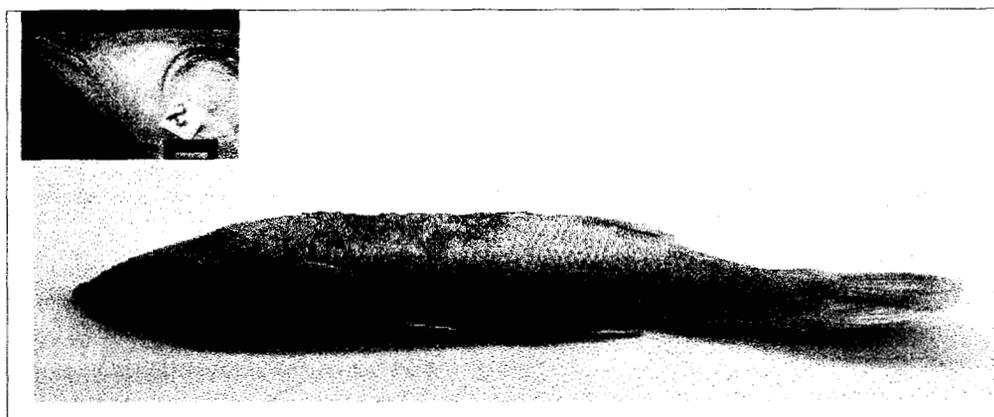


Figura 11. Fotografía de *C. lucius*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma patzcuaro* (Meek, 1902).**

Nombre común: Charal pinto (Martín del Campo, 1955), Kuerepo (P'urhépecha, Chacón-Torres *et al.*, 1991), "Patzcuaro silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Son organismos endémicos del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Los ejemplares presentaron escamas con márgenes lacinadas; el cuerpo es esbelto y la cabeza de subtriangular a triangular (Figura 12). Presentan dientes pequeños y en bandas y están ausentes en el vómer o palatinos (Barbour 1973 a). Se caracterizó por presentar 54-59 escamas de la serie longitudinal, 25-34 escamas predorsales, 15-19 rayos aleta anal, de 24-27 branquiespinas y los siguientes intervalos de valores morfométricos expresados como porcentaje de la longitud patrón: longitud cefálica 22.3-25, diámetro del ojo 6.3-6.8, longitud de la mandíbula 8.2-11.7 y longitud de la base de la aleta anal 13.0-16.6. Estos intervalos se encontraron dentro de los reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 11). La especie fue encontrada en muy raras ocasiones en el lago de Pátzcuaro y de acuerdo con otros autores (Rojas *et al.*, 1992; Jiménez y Gracia, 1995) se encuentra en la actualidad en densidades bajas, por lo que se considero que debería incluirse dentro de la NOM-059-ECOL-1984.

Tabla 11. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. patzcuaro*.

Carácter	1 (N = 3)	2 (N* = 15)
Escamas serie longitudinal	54-59 (57)	52-63 (N. D)
Escamas predorsales	25-34 (30.3)	24-34 (N. D)
Rayos aleta anal	15-19 (17.3)	15-18 (N. D)
Branquiespinas	24-27 (25)	23-29 (N. D)
Longitud cefálica*	22.3-25 (23.9)	24.5-25.9 (N. D)
Diámetro del ojo*	6.3-6.9 (6.8)	5.6-6.1 (N. D)
Longitud mandíbula*	8.2-11.7 (9.8)	8.8-9.9 (N. D)
Longitud base aleta anal*	13-16.6 (14.8)	16.6-20.6 (N. D)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible

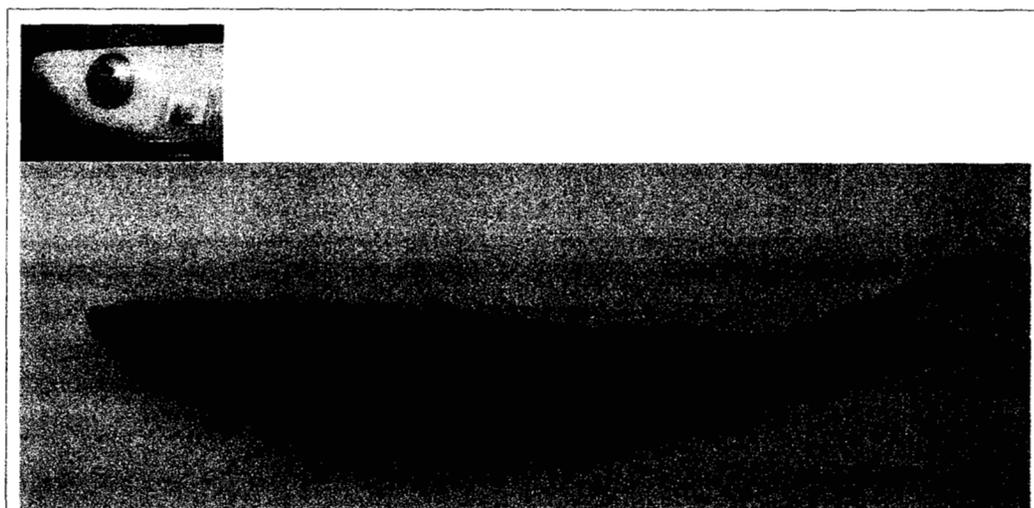


Figura 12. Fotografía de *C. patzcuaro*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

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

Nombre común: Pico negro (Guzmán, 1995), Charal boca negra, "Blacknose silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Descrito como *Otalia promelas* por De Buen (1945:529). Se caracterizó por presentar una cabeza triangular; el hocico pigmentado de negro además de ser largo y puntiagudo (Figura 13), dientes largos, en bandas, dirigidos posteriormente y ausentes en vómer y palatinos. Se relaciona con *C. sphyraena*, pero presenta mandíbula más corta. Esta especie presentó valores en el número de escamas predorsales (45-84 \bar{x} =56.7) muy parecidos a los valores de *C. estor* (50-90 \bar{x} =62.8), sin embargo tuvo un promedio mayor que ésta última en la distancia del hocico a la primera aleta dorsal (52-59, \bar{x} = 57 contra 50.4-60.2 \bar{x} =55.6) que permitió distinguirlo. Esta especie se encuentra, ocasionalmente en tallas adultas en el lago de Chapala.

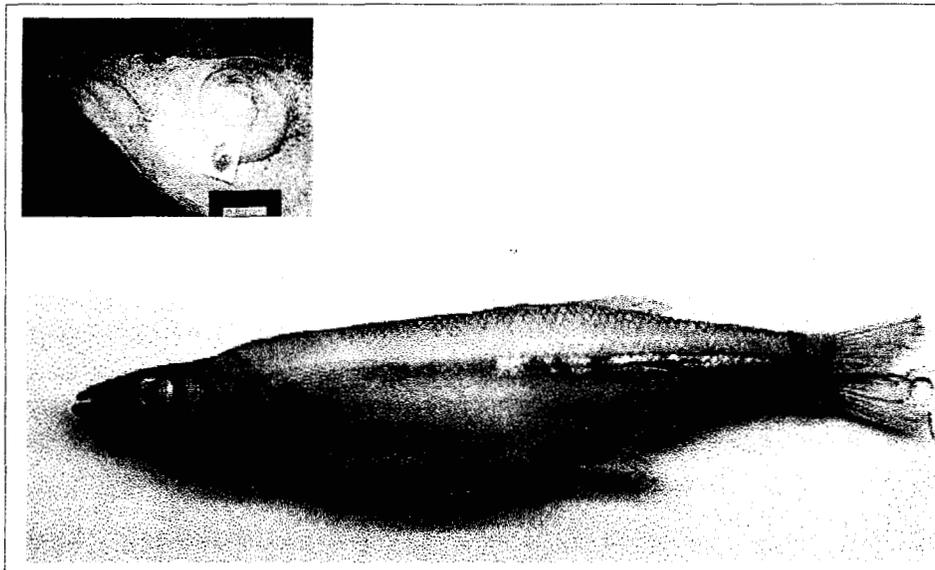


Figura 13. Fotografía de *C. promelas*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

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

Nombre común: Charal boca grande, "Bigmouth silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Descrito por primera vez como *C. diazi* (Jordan y Snyder 1899:137, *fide* Barbour, 1973a) y como *C. lermae* (Jordan y Snyder 1899:142, *fide* Barbour, 1973a). Son de cuerpo delgado y con forma de barracuda, con cabeza grande y triangular (Figura 14). Tienen un hocico puntiagudo, dientes grandes y en forma de caninos presentes en bandas en los premaxilares y en dos o tres hileras irregulares en los dentarios. Los dientes de la hilera más externos son de mayor tamaño y se encuentran ausentes en el vómer y los palatinos. Presentó escamas de la serie longitudinal 58-76, escamas interdorsales 13-19, branquiespinas 21-26 y los siguientes valores expresados como porcentajes de la longitud patrón: hocico 9.7-11.8 y mandíbula 8.9-14.5. A pesar su similitud con los valores obtenidos para *C. lucius*, *C. sphyraena* se distinguió de aquella por presentar un mayor número de escamas interdorsales (13-19, \bar{x} =16.3 contra 8-16, \bar{x} =12.37) y mayor altura de la segunda aleta dorsal (como porcentaje de la longitud patrón) (15.8-16.5, \bar{x} =14.3 contra 11.2-11.4, \bar{x} =12.9). Los intervalos de los valores descriptivos de esta especie se encuentran dentro de los reportados por Barbour (1973a) (Tabla 12). Esta especie al igual que sus congéneros peces blancos *C. promelas*, *C. lucius* y *C. estor* del Lago de Chapala, se encuentra en la actualidad en densidades muy bajas como adultos, debido principalmente a que el esfuerzo pesquero es ejercido sobre las tallas juveniles de estas especies las cuales son equivalentes a las de los charales. No permitiéndose el reclutamiento de esas cohortes a la población adulta.

Tabla 12. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. sphyraena*.

Caracteres	1 (N = 12)	2 (N* = 77)
Escamas serie longitudinal	58-76 (64.3)	56-11 (N. D)
Escamas interdorsales	13-19 (16.3)	8-29 (N. D)
Branquiespinas	21-26 (23.5)	23-28 (N. D)
Longitud hocico*	9.7-11.8 (10.4)	10.2-12.9 (N. D)
Longitud mandíbula*	8.9-14.5 (12.9)	12.6-15.2 (N. D)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible

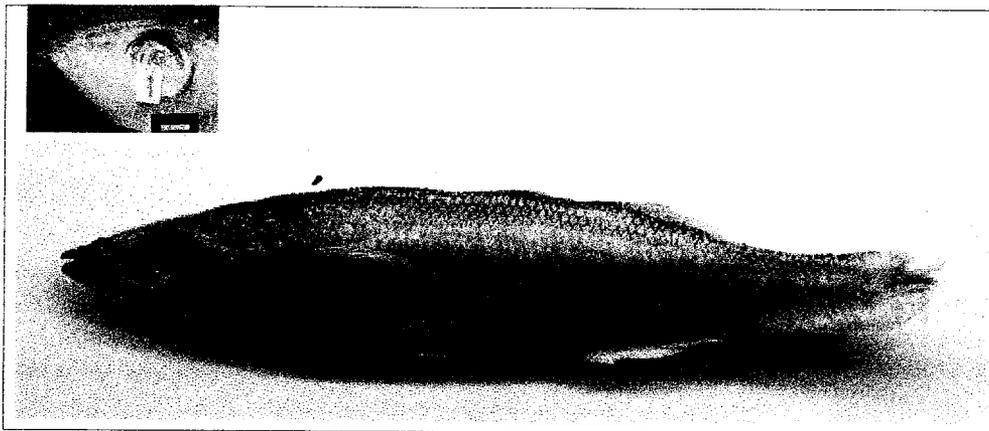


Figura 14. Fotografía de *C. sphyraena*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

Grupo Arge

***Chirostoma attenuatum* (Meek, 1902).**

Nombre común: Charal prieto, kuerepo turipiti (P'urhépecha, Martín del Campo, 1955), "Slender silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Es una especie endémica del Lago de Pátzcuaro y gran controversia dentro del género ya que ha sido sometida a varias revisiones taxonómicas. Meek (1902), la describe por primera vez como *C. attenuatum*. Al mismo tiempo que describe a otra especie del mismo lago, *C. patzcuaro*. Posteriormente, Regan en 1908 (*fide*: Solórzano 1961) la describe como *C. bartoni* (Jordan y Everman 1896). De Buen (1940), considera los trabajos descritos por Meek (1902) y concluye que *C. attenuatum* y *C. patzcuaro* son sinonimias. En 1940 (a) De Buen, propone que las dos especies descritas por Meek son los extremos de la variación de una sola especie (*C. bartoni*) y propone tres variedades: *C. bartoni* var. *attenuatum*, *C. bartoni* var. *janitzio* y *C. bartoni* var. *patzcuaro*. En 1941 el mismo autor incluye a esas variedades dentro de la sinonimia *C. bartoni*. Martín del Campo (1940), por otro lado considera que las especies *C. bartoni* y *C. patzcuaro* constituyen los extremos de variación de *C. regani* (reportada por Jordan y Hubbs, 1919 para Xochimilco). De Buen (1945), por su parte excluye a *C. regani* del Lago de Pátzcuaro y sugiere la segregación del género *Chirostoma* sp., en géneros y subgéneros, rehabilitando la nomenclatura propuesta por Jordan y Evermann en 1896. Sin embargo, Shultz (1948) refuta la desmembración propuesta por De Buen, ya que según el autor ésta

no establece una separación bien definida entre géneros y subgéneros. Posteriormente, Solórzano (1961) realiza una descripción detallada de las dos especies descritas con anterioridad por Meek y considera que cinco valores merísticos (escamas en serie longitudinal y predorsales, número de branquiespinas, radios de la aleta anal y vértebras), son suficientes para separar a estas especies. De acuerdo con Barbour (1973 a), esta especie se distribuye exclusivamente en los lagos de Pátzcuaro (*C. attenuatum*) y Zirahuén (*C. attenuatum zirahuen*). En el presente trabajo, *C. attenuatum* (Figura 15) presentó los siguientes intervalos en sus caracteres merísticos: escamas de la serie longitudinal 41 a 50, escamas predorsales 18 a 25 y branquiespinas 20 a 22. Además mostró los siguientes intervalos en caracteres morfométricos, expresados como porcentajes de la longitud patrón: de distancia hocico a 1ª aleta dorsal (43.9-60.6, \bar{x} =47.7), longitud del pedúnculo caudal (19.4-29.0, \bar{x} =25.9). Los intervalos de los caracteres merísticos se encontraron dentro de los reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 13) excepto por las medidas expresadas como porcentaje de la longitud patrón en donde se observaron valores más altos en el presente trabajo. Se encontró solamente en el Lago de Pátzcuaro.

Tabla 13. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. attenuatum*.

Caracteres	1 (N = 17)	2 (N* = 43)
Escamas serie longitudinal	41-50 (45.9)	43-51 (46.4)
Branquiespinas	20-22 (20.5)	20-24 (22)
Hocico a 1ª aleta dorsal*	43.9-61 (47.7)	43.1-46.2 (44.6)
Longitud pedúnculo caudal*	19.4-29 (25.9)	26.6-30.2 (N. D)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valore promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible

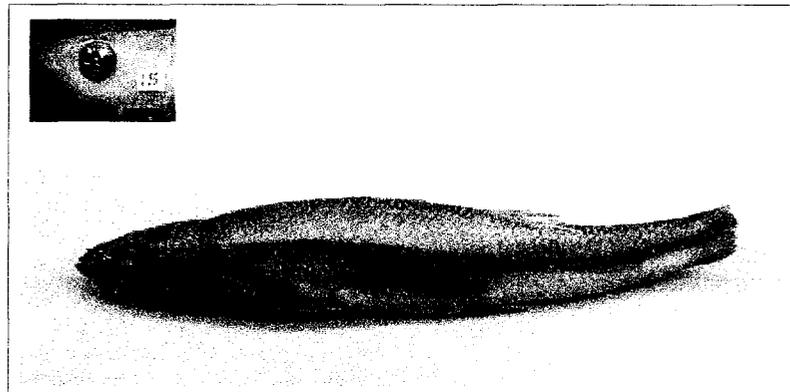


Figura 15. Fotografía de *C. attenuatum*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma attenuatum zirahuén* (Meek, 1902).**

Nombre común: no presenta

Son endémicos del Lago de Zirahuén. Tienen un cuerpo esbelto y cabeza subtriangular (Figura 16), dientes pequeños en dos hileras irregulares o bandas angostas y no presentes en el vómer o palatinos. Nuestros resultados muestran que *C. attenuatum zirahuén* se distinguió de su forma nominal *C. a. attenuatum* por presentar mayor número de escamas de la serie longitudinal (53-71 contra 41-50) y mayor número de escamas predorsales (22-45 contra 18-25), lo cual concuerda con lo reportado por Barbour (1973 a) (Tabla 14), así como una distancia del hocico a la 1ª dorsal (como porcentaje de la longitud patrón) que aunque mayor (37-51 contra 43.9-60.6), también se encuentra dentro de las que maneja Barbour (1973 a).

Tabla 14. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. a. zirahuén*

Caracteres	1 (N = 37)	2 (N* = 105)
Escamas serie longitudinal	53-71 (60.3)	48-70 (58.1)
Escamas predorsales	22-45 (26.3)	19-32 (25.2)
Hocico a 1ª aleta dorsal*	37-51 (38.7)	44.4-48.9 (46.6)

1= presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *= expresados como porcentajes de la longitud patrón.

Valores promedios en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio.

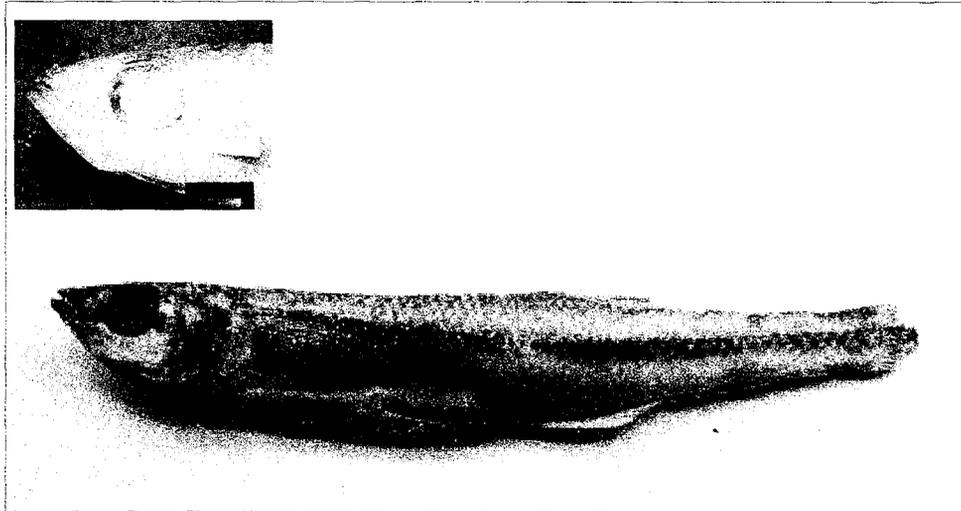


Figura 16. Fotografía de *C. a. zirahuen*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

***Chirostoma labarcae* (Meek, 1902).**

Nombre común: Charal de la Barca, "Sharpnose silverside" (Mayden *et al.* 1992).

Descrito por Regan (1906-08:59, *fide*: Barbour, 1973a), como *C. breve* y por DeBuen (1945:503 1946a: 277, 1946b: 114, *fide*: Barbour, 1973a) como *Eslopsarun labarcae*. Tienen cabeza triangular (Figura 17), escamas de la región predorsal lacinadas y de la línea lateral con canales (Figura 17), hocico en punta, dientes de pequeños a grandes, en hileras irregulares o bandas. Se caracterizó por presentar de 42-49 escamas de la serie longitudinal, de 16-17 branquiespinas, escamas de la región predorsal lacinadas y las de la línea lateral con canales. Además presentó los siguientes valores expresados como porcentaje de la longitud patrón: pedúnculo

caudal 18-20.8, altura de pectorales 21.3-22, base aleta anal 15-19.4, longitud cefálica 22.9-26.5 y hocico 8.1-9.3. Valores que también se encuentran dentro de los intervalos reportados por Barbour (1973 a) (Tabla 15). Cabe destacar que esta especie se encontró ocasionalmente en el lago de Chapala y con anterioridad ya ha sido considerada como rara por otros autores, por lo que es imperativo que se incluya en la NOM-059-ECOL-1984.

Tabla 15. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. labarcae*.

Caracteres	1 (N = 5)	2 (N* = 146)
Escamas serie longitudinal	42-49	39-47 (4.27)
Branquiespinas	16-17	15-20 (17.4)
Longitud pedúnculo caudal*	18-20.8 (19.2)	16.5-21.1 (N.D)
Altura aletas pectorales *	21.3-22 (21.8)	19.4-22.8 (N.D)
Longitud base aleta anal*	15-19.4 (17.4)	21.7-28.3 (N.D)
Longitud cefálica*	22.9-26 (24.8)	23.5-27.1 (25.4)
Longitud hocico*	8.1-9.3 (8.8)	8.3-9.9 (9)

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón. Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.

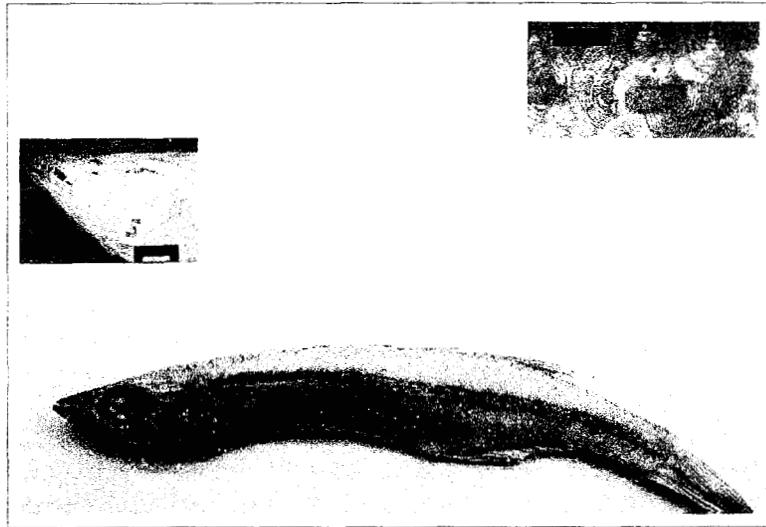


Figura 17. Fotografía de *C. labarcae*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza y en superior derecha detalle de escamas con canales.

***Chirostoma riojai* (Solórzano y López, 1965).**

Nombre común: Charal del Alto Lerma, "Toluca silverside" (Mayden, *et al.* 1992).

Caracterizada como *C. bartoni* por Evermann y Goldsborough [(1901:52); Meek (1902:112), (1904:172); Regan (1906-08:58) Jordan y Hubbs (1919:72); DeBuen (1940:49) *fide*: Barbour, 1973a], como *C. bartoni bartoni* por Álvarez (1950:100), 1970:124 y Álvarez y Cortés (1962:123) y como *Elopsarum bartoni bartoni* por De Buen (1945:506, 1946:114). Tienen dientes pequeños (Figura 18) y tuvo similitud de sus intervalos con los de *C. jordani*; pero *C. riojai* se diferenció por presentar intervalos superiores en todos los caracteres. Presenta de 12-18 branquiespinas, 10-16 rayos anales y los siguientes valores morfométricos expresados como porcentaje

de la longitud patrón: de 44.3-48.5 distancia predorsal y un diámetro del ojo de 4.9-5.0 (Tabla 16). Los ejemplares colectados en la Laguna de Santiago Tilapa, Estado de México fueron donados por el Candidato a Doctor Joel Paulo-Maya (ENCB-IPN).

Tabla 16. Comparación de intervalos de caracteres morfométricos y merísticos determinantes en *C. riojai*.

Caracteres	1 (N = 10)	2 (N* = 168)
Branquiespinas	12-18 (14.1)	12-18
Rayos aleta anal	10-16 (13.1)	10-16
Hocico a 1ª aleta dorsal*	44.3-48.5 (47)	45.2-48.4
Diámetro del ojo*	4.9-5.0 (5.4)	5.1-6.0

1=presente trabajo; 2= Barbour (1973a); *=expresados como porcentajes de la longitud patrón.

Valores promedio en paréntesis. N = tamaño de muestra. N* = tamaño de muestra promedio. N.D = no disponible.

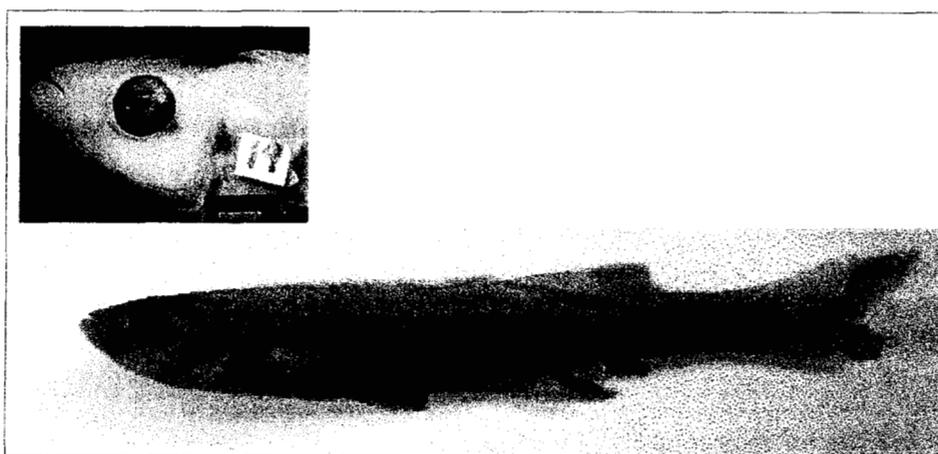


Figura 18. Fotografía de *C. riojai*. En la parte superior izquierda se presenta detalle de la cabeza.

Las diferencias observadas en los valores mínimos y máximos de la mayoría de los caracteres descriptivos de las especies de charales y tallas juveniles de especies de peces blancos entre el presente estudio y aquellos reportados por Barbour (19874a) pudieron deberse a tres factores principalmente: 1) a la imprecisión en la medición, ya que en el presente estudio se utilizó un vernier manual y en el caso de organismos muy pequeños el error es mayor; 2) a las diferencias en el tamaño de muestra y a las 'clases de edad' utilizadas entre ambos trabajos y 3) a diferencias reales entre las poblaciones analizadas por Barbour (1984a) incluyendo los tipos y las colectadas en el presente trabajo, lo cual representa un periodo amplio de tiempo (de más de tres décadas). Este último factor puede argumentarse con los cambios observados y reportados por Barriga-Sosa *et al.*, (en prep.) en poblaciones de *C. grandocule* del Lago de Pátzcuaro, en donde se sugiere que pueden detectarse diferencias morfológicas y genéticas entre sitios y entre años. Los autores mencionan que las diferencias morfológicas entre sitios se observaron en los siguientes caracteres: diámetro del ojo, alturas de la segunda aleta dorsal y de la aleta pélvica, longitudes de la mandíbula, del hocico, pedúnculo caudal y de la base de la aleta anal. Además de las distancias del hocico a la segunda aleta dorsal, pre-pélvica y postorbital.

Con relación al carácter longitud total (LT), en la Tabla 17 se muestran las diferencias entre las trece especies y tres subespecies identificadas para el género *Chiostoma*. Se presenta, el número de muestra por especie identificada, la talla promedio por especie (\bar{x}), varianzas y rangos de tallas (LS Mínima y Máxima en mm). Los

promedios de talla de cinco especies y una subespecie de peces blancos (125.45 – 187.30 mm) caen dentro de los valores mínimos observados por otros autores (165 mm, Barbour 1973a, Alaye 1993a). De igual manera los valores promedio, observados en la talla de las especies de charales (50.54 – 83.33 mm) caen dentro de los reportados por otros autores (45 –160 mm, Barbour 1973a, Alaye 1993a, Sánchez 1992).

Sin embargo, es importante mencionar que la mayoría de las especies de peces blancos tanto en el Lago de Chapala como en el Lago de Pátzcuaro, se presentan en la actualidad en densidades muy bajas, ya que en su mayoría son capturadas en la pesca “comercial” como charales.

Las pruebas de normalidad y homocedasticidad mostraron que la mayoría de los datos tanto morfométricos como merísticos presentan una distribución normal y varianzas semejantes, por lo que para el análisis univariado no se hizo ningún tipo de transformación.

Tabla 17. Tallas promedio (mm), máximas y mínimas de la longitud patrón de las trece especies y tres subespecies estudiadas.

Especies	N	\bar{x}	Varianza	Min.	Máx.	E.E
<i>C. attenuatum attenuatum</i>	17	67.53	14.39	62	75	0.93
<i>C. attenuatum zirahuen</i>	37	81.35	64.07	68	102	1.51
<i>C. consocium consocium</i>	92	71.15	80.37	58	107	1.15
<i>C. consocium reseratum</i>	12	70.33	87.15	61	95	7.42
<i>C. chapalae</i>	53	65.50	19.83	55	91	1.11
<i>C. estor estor</i>	39	159.9	2360.00	83	278	8.80
<i>C. estor copandaro</i>	13	108.5	236.4	91	144	4.96
<i>C. grandocule</i>	206	68.86	24.13	60	83	0.54
<i>C. humboldtianum</i>	89	107.4	750.86	74	225	3.16
<i>C. jordani</i>	39	50.54	27.20	42	61	0.91
<i>C. labarcae</i>	5	72.20	250.7	61	100	88.6
<i>C. lucius</i>	19	143.9	2129.00	98	245	11.74
<i>C. patzcuaro</i>	3	83.33	121.3	72	94	5.48
<i>C. promelas</i>	12	110.8	540.6	77	139	2.95
<i>C. riojai</i>	10	69.9	32.99	61	80	1.49
<i>C. sphyraena</i>	12	106.9	169.9	82	127	4.46
Total	658					

N= número de muestra; \bar{x} = media; E.E.= error estándar.

ANALISIS UNIVARIADO.

Las 13 especies y 3 subespecies incluidas en este estudio muestran tanto para los caracteres morfométricos como para los merísticos, coeficientes de variación ($SD/\bar{x} \times 100$) que van de 27.5 al 103% y de 8.5 al 43.4% para los caracteres morfométricos y merísticos respectivamente (Tabla 18). El carácter morfométrico más variable, altura aleta pectoral (AAP) fue 1.9 y 2.2 veces más variable que los caracteres longitud de la mandíbula (LM), del hocico (LH), postorbital (LPo) y longitud de la cabeza (LC) y hasta 3.6 a 3.7 veces más variable que los caracteres altura de la primera y segunda aleta dorsales (A1D y A2D) (Tabla 18).

Por otro lado, el carácter merístico rayos aleta pectoral (RAp) fue 4.9 a 5.1 veces más variable que los caracteres menos variables, rayos primera aleta dorsal (R1D), y espinas primera aleta dorsal (E1D) y 1.2 veces más variable que el carácter escamas predorsales (EPd) (Tabla 18). Aunque los niveles de variación son bajos, el análisis de ANDEVA de una vía indica que existen diferencias significativas en los valores entre especies (Tabla 17) tanto en los caracteres morfométricos como en los merísticos (excepto en el carácter número de rayos de aleta pectoral).

Tabla 18. Estadística descriptiva de los caracteres morfométricos y merísticos de las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma* analizadas en el presente estudio. Se muestran los resultados del ANDEVA de una vía (F y p).

Carácter	(N)	\bar{x} (mm)	Varianza	Desviación	Coefficiente de variación	F	p
Morfométricos							
Longitud estándar	658	83.7	1106.0	33.2	39.7	92.97	0.000
Longitud cabeza	658	22.5	107.7	10.4	46.8	98.28	0.000
Diámetro ojo	658	6.0	3.76	1.9	32.0	58.63	0.000
Longitud hocico	658	7.4	14.9	3.9	52.4	112.5	0.000
Longitud mandíbula	658	9.5	26.1	5.1	53.8	103.5	0.000
Longitud postorbital	658	9.5	22.7	4.8	49.9	91.57	0.000
Longitud pedúnculo caudal	658	17.7	42.1	6.5	36.7	75.95	0.000
Longitud base aleta anal	658	17.8	38.5	6.2	34.9	73.26	0.000
Longitud predorsal 1	658	43.9	357.7	18.9	43.1	102.9	0.000
Longitud predorsal 2	658	55.0	497.4	22.3	40.5	97.34	0.000
Longitud prepélvica	658	36.8	256.5	16.0	43.5	90.66	0.000
Longitud base aleta pélvica	658	4.0	2.6	0.7	40.1	12.97	0.000
Altura cuerpo	658	15.6	39.7	6.3	40.3	80.07	0.000
Altura mínima pedúnculo	658	7.3	5.9	2.4	33.1	98.01	0.000
Altura aleta anal	658	13.8	14.6	3.8	27.6	81.29	0.000
Altura aleta pectoral	658	15.7	234.0	16.2	103.0	3.026	0.000
Altura 1ª aleta dorsal	658	7.8	5.0	2.2	28.9	47.28	0.000
Altura 2a aleta dorsal	658	13.1	13.0	3.6	27.5	73.65	0.000
Merísticos							
Escamas serie longitudinal	658	Número	64.9	8.0	13.7	86.18	0.000
Escamas predorsales	658	58.6	211.2	14.5	33.9	143.10	0.000
Escamas interdorsales	658	42.8	1.2	1.1	8.6	41.55	0.000
Rayos aleta pectoral	658	13.1	4.6	2.1	43.4	1.63	0.060
Espinas 1ª aleta dorsal	658	5.0	1.1	1.1	8.9	18.57	0.000
Second dorsal fin rays	658	12.0	15.7	4.0	16.0	244.29	0.000
Rayos aleta anal	658	24.9	4.8	2.2	22.4	74.70	0.000
Branquiespinas	658	9.8	3.3	1.9	9.0	49.12	0.000

N= tamaño de muestra; \bar{x} = media; coeficiente de variación = (SD/ \bar{x} x 100). (p ≤ 0.05)

ANÁLISIS MULTIVARIADO

Para el análisis multivariado se siguieron dos estrategias: 1) el análisis de todas las especies (658 individuos), 2) el análisis de las especies por separado y de acuerdo a la clasificación de Barbour (1974a), para las especies del grupo Jordani (10 especies y 2 subespecies, 589 organismos) y para las especies del grupo Arge (tres especies y una subespecie, 69 organismos). Los mejores resultados y los cuales se reportan en el presente trabajo se observaron al analizar a las especies por grupo (Jordani y Arge).

- **Análisis Morfométrico (M).**

Para los datos morfométricos, los mejores resultados para el grupo Jordani los resolvió el ACP. Mientras que para el grupo Arge, CO resolvió los mejores resultados.

Para el grupo Jordani y los datos originales (M_o) y transformados a logaritmos (M_i), el APC resolvió solamente un componente. Mientras que para el grupo Arge, el APC para los datos M_o resolvió tres componentes y para los datos M_i solamente uno. Las matrices de correlación de ambos datos (M_o y M_i) y para ambos grupos (Jordani y Arge) mostraron que los datos son de igual signo y magnitud, lo cual indica que el efecto de la talla aún ésta presente (Cuadras, 1991). Por otro lado y para el grupo Jordani los resultados con los datos M_{ii} mostraron la acumulación de la varianza en cuatro componentes (Tabla 19), por lo que estos datos fueron utilizados

para análisis posteriores. Para el grupo Arge, los mejores resultados los resolvió el análisis de CO con los datos M iii (Tabla 19).

A continuación se muestran las varianzas acumuladas en los ejes resultantes para los análisis de APC y CO y solamente para los datos cuyas matrices de correlación mostraron ser de diferente signo y magnitud en el caso de los datos M ii, M iii de las 13 especies y tres subespecies que comprenden los grupos: Jordani y Arge incluidas en el presente estudio.

Tabla 19. Tabla de las varianzas acumuladas en los primeros cuatro ejes resultantes de los análisis componentes principales (ACP) y de correspondencia (CO) para las especies del grupo Jordani (10 especies y 2 subespecies) (arriba) y para las especies del grupo Arge (tres especies y 1 subespecie) (abajo).

Medida	Proc.	Análisis	CP I	CP II	CP III	CP IV
Morfométrica	(ii)	ACP	37.04	54.08	60.98	66.56
Merísticos	(o)	ACP	37.95	57.09		
<hr/>						
Medida	Proc.	Análisis	CP I	CP II	CP III	CP IV
Morfométrica	(iii)	CO	85.67	89.26	91.2	92.79
Merísticos	(o)	ACP	47.11	62.99		
	(o)	CO	97.48	94.0	96.38	98.01

ii = proporciones; iii= normalizados; o = originales

Para el grupo más numeroso (Jordani), el APC con los datos M ii mostró una matriz de correlación que revela que estos son de diferente signo y magnitud. Sin embargo, solamente seis de los 18 caracteres analizados presentaron una varianza mayor al 35%, estos caracteres se distribuyen de la siguiente manera: primer componente (PC I) con un porcentaje del 37.05% incluye solamente a la variable DH2D, PC II con un 17.04% incluye a las variables AAA, A1D y A2D, el PCIII a las variables LpC y LS y el PC IV a la variable AAP.

A las seis variables resueltas en el APC con los datos M ii se les aplicó posteriormente un análisis discriminante (AD), para determinar su significancia en la discriminación de las 12 especies. Sin embargo el AD no resolvió funciones discriminantes con niveles de significancia ($P < 0.05$, 95%) y el porcentaje total promedio de clasificación (C) fue de tan solo el 28%, por lo que los datos morfométricos (M ii) no fueron informativos en la separación de las 12 especies del grupo Jordani.

Aunque los datos morfométricos no revelaron una diferenciación clara entre especies del grupo Jordani (C = 28%). Es importante mencionar que los trabajos en los que se reporta la utilización de caracteres morfométricos para diferenciar a todas o a la mayoría de las especies del género es inexistente. Solamente existen trabajos en los que se incluyen a algunas especies del género (Barriga-Sosa *et al.*, en prensa a; Barbour y Chernoff, 1984) o se analiza a poblaciones de especies particulares (Barriga-Sosa *et al.*, en prep. b). En los trabajos de Barriga-Sosa *et al.*, (en prensa a

y en prep. b) se incluyen a siete especies (especies del grupo "*humboldtianum*") y a dos poblaciones de la especie *C. grandocule*, respectivamente. El primer trabajo incluye a las especies (*C. promelas*, *C. sphyraena*, *C. lucius*, *C. estor*, *C. grandocule*, *C. humboldtianum* y *C. c. consocium*) al cual se considera como monofilético porque presenta altas similitudes genéticas y morfológicas (Echelle y Echelle, 1984; Barriga-Sosa *et al.*, en prensa a), en dicho trabajo se demuestra que cinco caracteres morfométricos (LC, LPo, LbAp, DH1D y LBAa) y dos merísticos (RAA y RAP) son suficientes para discriminar a algunas de las siete especies. En dicho trabajo se concluye que dichos caracteres están asociados con la diversidad en los hábitos alimenticios y con los requerimientos natatorios de los organismos en la columna de agua, ya que varias de estas especies coexisten en el mismo hábitat. Por otro lado, en el mismo trabajo y en Barriga-Sosa *et al.*, (en prep. b) se concluye que los caracteres morfométricos A2D, DH1D, DHP, LPo, DO, LM, LBAa, AaP, LC y LPc son informativos en la discriminación de muestras de la especie *C. grandocule* del lago del Pátzcuaro. Barbour y Chernoff (1984) también muestran que dos de las especies del grupo (*C. lucius* y *C. sphyraena*) se diferencian por medio del análisis multivariado de ocho caracteres morfométricos (OrB, A2D, AAA, AaP, LH; DH2D y amplitud inter-orbital).

Para el grupo Arge, por otro lado, el análisis de CO con los datos M iii mostró una matriz de correlación que revela que estos son de diferente signo y magnitud (Tabla 20). El gráfico de la matriz factorial de éste análisis muestra una clara separación de las tres especie y una subespecie que comprende el grupo (Figura 20). Los

separación de las tres especies y una subespecie que comprende el grupo (Figura 20). Los caracteres que aportaron la variación más alta en este análisis y que permitieron la separación de las especies en el gráfico fueron: LT, AmaxC, LPc, A2D y LPp en la función I; y LBAa, DH1D y A1D en la función II.

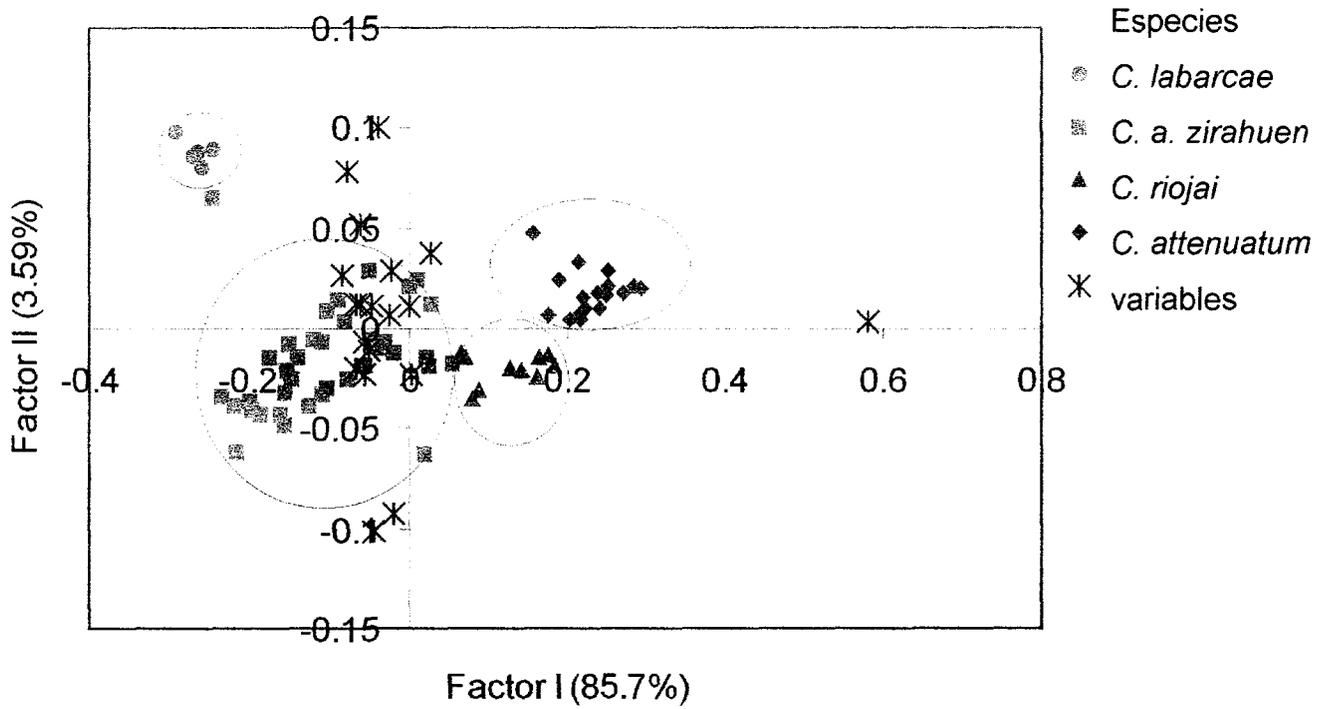


Figura 20. Gráfico de los factores I y II del análisis de CO para las especies y subespecie del grupo Arge.

Tabla 20. Matriz de correlación de los 18 caracteres morfométricos, M iii (abajo) generados con CO para las especies del grupo Arge.

Caracter	LS	LC	OrB	LH	LM	LPo	LPc	LbAA	DH1D	DH2D	LPp	LBAp	AmaxC	AminPc	AAA	AAP	A1D	A2D
LS	1																	
LC	.30	1																
OrB	.01	.10	1															
LH	.23	.49	-.04	1														
LM	.24	.40	-.10	.70	1													
LPo	.24	-.16	-.10	.60	.70	1												
LPc	.30	.04	-.08	-.16	-.18	-.10	1											
LBAa	.07	.46	.25	-.06	-.05	-.05	-.11	1										
DH1D	.38	.44	.06	.49	.52	.46	-.12	.10	1									
DH2D	.37	.34	.21	.38	.35	.38	-.07	.25	.69	1								
LPp	.37	-.04	.05	.39	.39	.38	-.03	.12	.45	.51	1							
LbAp	.03	.17	.12	-.16	-.17	.06	.09	.13	-.05	.10	.04	1						
AmaxC	.16	.05	.20	.13	.15	.27	.07	.21	.28	.40	.34	.18	1					
AminPc	-.01	-.05	.27	.01	-.05	.11	.04	.21	.13	.25	.13	.24	.47	1				
AAA	-.06	-.03	.39	-.18	-.23	-.18	.05	.46	-.01	.16	.07	.21	.33	.48	1			
AAP	.00	-.17	.00	-.06	-.03	-.04	.05	.03	.00	.03	.01	.03	.11	.07	.06	1		
A1D	-.02	-.08	.25	-.23	-.28	-.13	.16	.21	-.16	.07	-.04	.25	.31	.44	.45	.07	1	
A2D	-.10	.04	.34	-.21	-.30	-.13	.11	.33	-.06	.20	.10	.28	.38	.52	.63	.02	.57	1

Posteriormente, los ocho caracteres que se resolvieron en el análisis CO, se sometieron a un AD, para determinar su significancia en la discriminación de las especies del grupo Arge. Los resultados mostraron que en éste análisis se resolvieron dos funciones discriminantes con niveles de significancia ($P < 0.05$, 95%) y con un porcentaje promedio total de clasificación (C) del 89.9% (Tabla 21). Los caracteres que contribuyeron de manera más significativa en las funciones discriminantes de las especies fueron: LPc, DH1D y SL en la primera función discriminante y los caracteres A1D, DH2D y LPp en la segunda función discriminante.

Tabla 21. Clasificación de las especies del grupo Arge generada por el AD y los datos M iii. Se muestra el número de individuos clasificados y en paréntesis porcentaje de clasificación.

Especie	3 N =5	8 N =37	12 N =10	16 N= 17
3	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
8	0 (0%)	32 (86.4%)	2 (5.4%)	3 (8.1%)
12	0 (0%)	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)
16	0 (0%)	0 (0%)	1 (5.8%)	16 (94.1%)

N= número de muestra; 3= *C. labarcae*, 8= *C. a. zirahuen*, 12= *C. riojai* y 16= *C. a. attenuatum*.

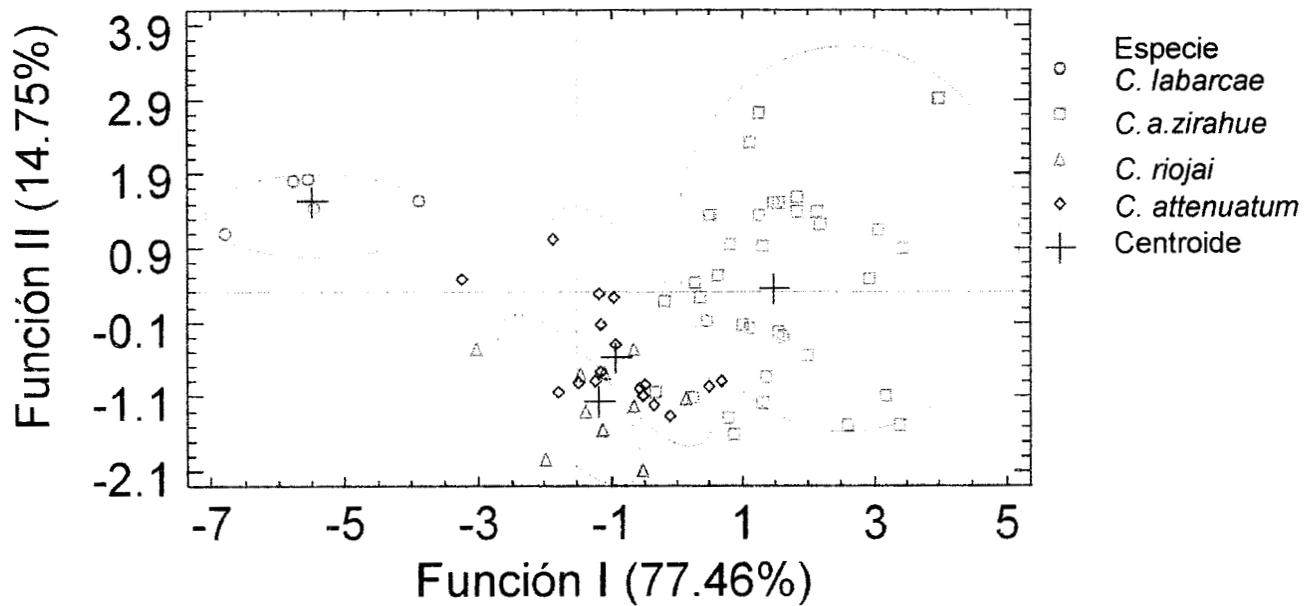


Figura 21. Gráfico de las funciones discriminantes I y II del AD para las especies y subespecie del grupo Arge.

La utilización del AD en especies del género y para caracteres morfométricos solamente ha sido reportado como herramienta para buscar caracteres discriminantes entre las siete especies del grupo "*humboldtianum*" (Barriga-Sosa *et al.* en prensa); para elucidar características morfo-funcionales de tres especies de *Chirostoma* del Lago de Chapala (Rodríguez y Granado, 1987); y para determinar la diferenciación entre cinco especies simpátricas del mismo lago Rodríguez y Granado (1988 a). Por lo que es evidente que la utilización de estos caracteres es de gran importancia para discriminar entre especies y/o poblaciones del género.

- **Análisis Merístico (m).**

Al igual que en el análisis multivariado de los datos de caracteres morfométricos, para los datos de caracteres merísticos, los mejores resultados para el grupo Jordani los resolvió el APC mientras que para el grupo Arge los resolvió el análisis de CO.

Para el grupo Jordani el APC resolvió una varianza total acumulada de solamente el 57.09% en dos componentes. Los resultados del APC indican que el primer componente (CP I) está altamente representado por el número de escamas de la línea lateral (ELI), escamas interdorsales (EID), número de rayos de la aleta pectoral (RAP), seguido por el número de rayos de la segunda aleta dorsal (R2D). Mientras que el CP II está altamente representado por el número de branquiaspinas (BE), por el número de rayos de la primera aleta dorsal (R1D) y por el número de escamas predorsales (EPD) (Tabla 22).

Los ocho caracteres merísticos se sometieron a un análisis (AD) y los resultados mostraron que las ocho variables resolvieron dos funciones discriminantes con niveles de significancia ($P < 0.05$, 95%) y con un porcentaje promedio total de clasificación (C) del 71.1% (Tabla 23). Sin embargo, la distribución de las especies en el gráfico de las dos funciones discriminantes muestra una clara separación solamente en dos especies (*C. grandocule* y *C. jordani*) de las doce analizadas (Figura 22). El traslape observado en 10 de las especies se debe principalmente a dos factores: 1) a que el número de muestra de algunas de estas especies es muy pequeño y no estadísticamente representativo y 2) a que siete de las especies, los

miembros del grupo “*humboldtianum*” presentan altos niveles de similitud genética y morfométrica (Echelle y Echelle, 1984; Barriga-Sosa *et al.*, en prensa a), por lo que los centroides de este grupo de especies (10) se encuentran muy cerca uno de otro.

Tabla 22. Matriz factorial I y II del APC para los datos morfológicos del grupo Jordani. Los valores >0.30 se marcan con negritas.

Caracter	Factor I	Factor II
Rayos aleta anal	0.2885	0.2554
Rayos 1ª dorsal	0.0429	0.5810
Rayos 2ª dorsal	0.3247	0.0278
Branquiespinas	0.2230	0.5984
Escamas interdorsales	0.4378	-0.1791
Escamas línea lateral	0.4850	-0.0103
Escamas predorsales	0.3881	-0.4520
Rayos aleta pectoral	0.4266	0.0416

Tabla 23. Clasificación de las especies del grupo Jordani generado con el AD y los datos m o. Se muestra el número de individuos clasificados y en paréntesis porcentaje de clasificación.

Sp	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	13	14	15
	N=92	N=92	N=92	N=200	N=40	N=3	N=12	N=12	N=54	N=12	N=40	N=19	N=13
1	53	3	3	2	1	1	7	10	3	5	4	2	1
	(58)	(3)	(2)	(2)	(1)	(1)	(8)	(11)	(3)	(5)	(4)	(2)	(1)
2	5	51	0	0	0	0	7	6	4	6	1	1	11
	(5.4)	(55.4)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(7.7)	(6.5)	(4.3)	(6.5)	(1)	(1.1)	(11.96)
4	1	0	197	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	(0.5)	(0.0)	(98.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.00)	(0.0)	(0.5)
5	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
6	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(66.7)	(0.0)	(33.3)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
7	1	1	0	0	0	0	7	2	0	0	0	0	1
	(8.3)	(8.3)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(58.3)	(16.7)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(8.3)
9	3	5	0	0	0	0	12	32	1	0	0	0	1
	(5.6)	(9.3)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(22.2)	(59.3)	(1.8)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.8)
10	2	3	0	0	0	0	0	0	5	0	0	1	1
	(16.7)	(25)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(41.7)	(0.0)	(0.0)	(8.3)	(8.3)
11	7	5	0	0	0	0	0	0	2	8	4	10	4
	(17.5)	(12.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(5.0)	(20)	(10)	(25)	(10)
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	0	0
	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(8.3)	(91.7)	(0.0)	(0.0)
14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	10	1
	(10.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(21)	(10.5)	(52.7)	(5.3)
15	4	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	3
	(30.8)	(15.4)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(12.4)	(15.4)	(0.0)	(0.0)	(23.1)

M= muestra; N= número de muestra; 1= *C. humboldtianum*; 2= *C. c. consocium*; 4= *C. jordani*; 5= *C. patzcuaro*; 6= *C. c. reseratum*; 7= *C. chapalae*; 9= *C. promelas*; 10= *C. e. estor*; 11= *C. sphyraena*; 13= *C. lucius* y 14= *C. e. copandaro*.

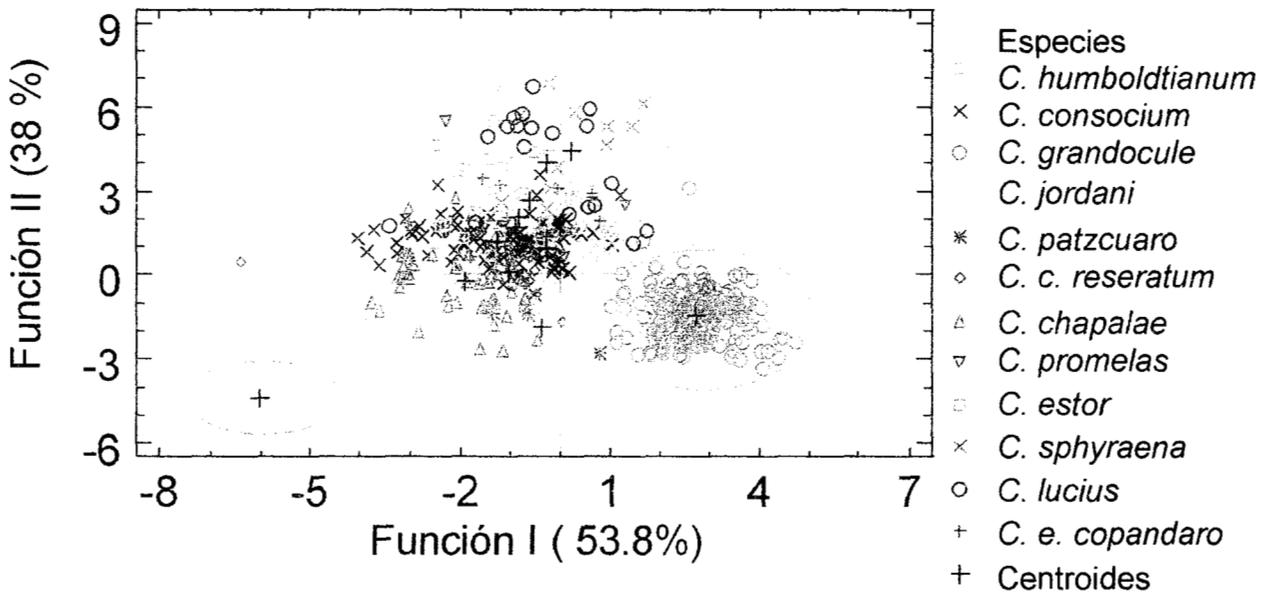


Figura 22. Gráfico de las funciones discriminantes I y II del AD para las especies subespecies del grupo Jordani.

Las variables que contribuyeron a la discriminación de las especies *C. jordani* y *C. grandocule* del resto del grupo Jordani fueron en número de branquiespinas (BE) en la primera función discriminante y el número de escamas predorsales (EPD) e interdorsales (EID) en la segunda función discriminante.

Para el grupo Arge, por otro lado el análisis de CO resolvió casi la totalidad de su varianza en cuatro factores (98.01%, ver Tabla 19). Los resultados indican que el primer factor esta altamente representado por el número de rayos de la aleta anal (RAA), número de rayos de la primera y segunda aletas dorsales (R1D y R2D) y por

los rayos de la aleta pectoral (RAP). El segundo factor esta altamente representado por el número de escamas interdorsales (EID) y el tercer factor por el número de branquiespinas (BE) y por el número de escamas de la línea lateral (ELI) (Tabla 24).

Tabla 24. Matriz factorial I, II y III del análisis de CO para los datos m o del grupo Arge. Los valores >0.04 se marcan con negritas.

Caracter	Factor I	Factor II	Factor III
Rayos aleta anal	0.2196	-0.0090	-0.8481
Rayos 1ª dorsal	-0.0473	-0.0040	0.0270
Rayos 2ª dorsal	-0.0599	0	0.4821
Branquiespinas	-0.0325	0.0240	-0.4421
Escamas interdorsales	0.0090	0.0641	0.5690
Escamas línea lateral	-0.0196	0.0060	0.1813
Escamas predorsales	-0.0385	-0.01	-0.0044
Rayos aleta pectoral	-0.0550	-0.048	-0.1643

Los resultados del AD con las ocho variables m o mostraron que estas resolvieron dos funciones discriminantes con niveles de significancia ($P < 0.05$, 95%) y con un porcentaje promedio total de clasificación (C) del 98.6% (Tabla 25). La distribución de las especies en el gráfico de las dos funciones discriminantes muestra una clara separación para las cuatro especies del grupo Arge. Los caracteres que

contribuyeron de manera más significativa en las funciones discriminantes de las especies fueron: en la primera función discriminante los caracteres número de branquiespinas (BE), número de escamas de la línea lateral (ELI) y número de rayos de la primera aleta dorsal (R1D) y los caracteres número de rayos de la aleta anal (RAA) y número de escamas interdorsales (EID) en la segunda función discriminante.

Tabla 25. Clasificación de las especies del grupo Arge generada por el AD y los datos m o. Se muestra el número de individuos clasificados y en paréntesis porcentaje de clasificación.

Especie	3 N =5	8 N =37	12 N =10	16 N= 17
3	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
8	0 (0%)	37 (97.4%)	0 (0%)	1 (2.6%)
12	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)
16	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (100%)

N= número de muestra; 3= *C. labarcae*, 8= *C. a. zirahuen*, 12= *C. riojai* y 16= *C. a. attenuatum*.

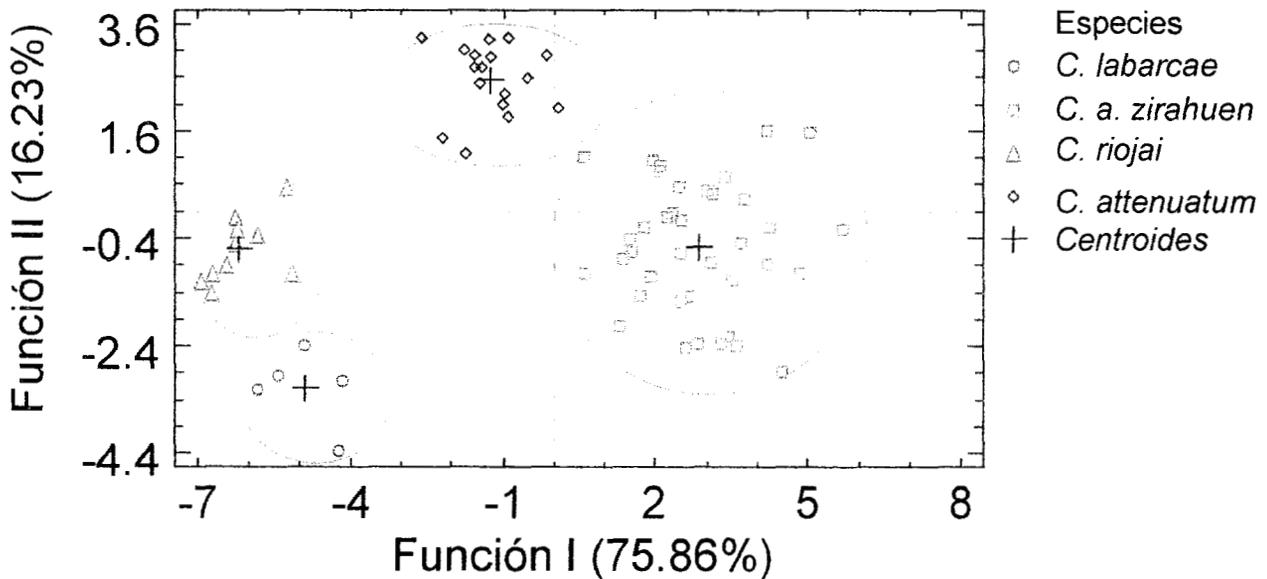


Figura 23. Gráfico de las funciones discriminantes I y II del AD y los datos mo, para las especies y subespecie del grupo Arge.

Como se mencionó anteriormente la utilización del AD en especies del género y con caracteres merísticos se restringe a lo reportado por Barriga-Sosa *et al.*, (en prensa a) en la discriminación de poblaciones de la especie *C. humboldtianum* de siete especies del grupo Jordani. Además de lo reportado por Rodríguez y Granado (1987, 1988) en la diferenciación del aparato mandibular de especies de *Chirostoma* del Lago de Chapala. Por lo que se considera que los caracteres merísticos son potenciales marcadores que pueden ser utilizados en discriminación de poblaciones y/o especies del género.

ANÁLISIS MOLECULAR

Alozimático.

Sistemas ensayados y designación de alelos.

Los sistemas amortiguadores de corrimiento electroforético Tris-glicina (pH 8.5) y CAAMP generaron los mejores resultados (resolución y número de bandas, así como repetitividad de los resultados). Para el análisis de las 13 especies y tres subespecies se detectó un total de 23 loci enzimáticos en 17 sistemas ensayados. Nueve loci fueron polimórficos, diez monomórficos y cuatro no presentaron actividad. En la Tabla 26 se muestran los sistemas alozimáticos ensayados en las 13 especies y tres subespecies, incluyendo el nombre completo de las enzimas analizadas, su abreviatura, número E.C. (por sus siglas en inglés Enzyme Commission number, IUB 1984, Sistema numérico del código de enzimas), condiciones de corrimiento, si son monomórficas o polimórficas y el número de locus observados. Se detectó solamente un locus para Gcdh, 6Gpdh, G3pdh, Me, Hbd, y Pgm, dos loci se detectaron en el caso de Adh, Idh, Ldh, P6gdh y Xdh y tres en Gpi, Mdh y Me. Debido a que la enzima Me presentó inconsistencia en los resultados fue excluida del análisis.

Tabla 26. Sistemas ensayados en 13 especies y tres subespecies de *Chirostoma*.

Enzima	Abr.	Número E.C.	Buffer	Voltaje/ Minutos	P/M	Loci
Alcohol deshidrogenasa	Adh	1.1.1.1	G, C, B	250/25	M	Adh-1
					M	Adh-2
Enzima málica	Me	1.1.1.40	G, B, C	220/20	M	Me-1
					M	Me-2
					M	Me-3
Fosfatasa alcalina	Alp	3.1.3.1	G	300/30	--	--
Fosfoglucomutasa	Pgm	5.4.2.2	G, D, B	250/35	P	Pgm-1
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	6Pgdh	1.1.1.44	G, D, C, E	300/25	M	6Gpdh-1
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa	Gpdh	1.2.1.12	G	300/25	M	Gpdh-1
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	G6pdh	1.1.1.49	G	300/25	P	P6gdh-1
					P	P6gdh-2
Glucosa deshidrogenasa	Gcdh	1.1.1.118	G	320/30	M	Gcdh-1
Glucosa 6-fosfato isomerasa	Gpi	5.3.1.9	G	250/30	P	Gpi-1
					P	Gpi-2
					P	Gpi-3
Glutamato transaminasa	Got	2.6.1.1	G	300/25	--	--
Hexoquinasa	Hex	2.7.1.1	G, CA	250/30	M	He-1

Continúa Tabla 26.

Hidroxiacetato deshidrogenasa	Hbd	****	G	350/35	M	Hbd-1
Isocitrato deshidrogenasa	Idh	1.1.1.42	G, E, B, C, CA, D	250/20	M	Idh-1 Idh-2
Lactato deshidrogenasa	Ldh	1.1.1.27	G, E, B, D	300/35	P P	Ldh-1 Ldh-2
Malato deshidrogenasa	Mdh	1.1.1.37	G, B, C	250/25	M M	Mdh-1 Mdh-2
Xantina deshidrogenasa	Xdh	1.1.1.204	G, B	250/25	M M	Xdh-1 Xdh-2
Superóxido dismutasa	Sod	1.15.1.1	G, B	220/20	--	--

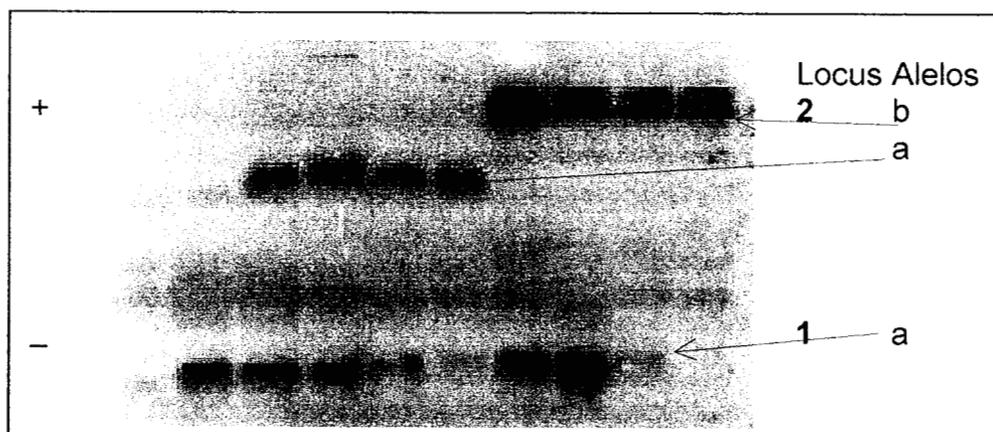
Amortiguadores ensayados: G= Tris glicina, pH= 8.5; B= Tris EDTA borato, pH= 8.5; C= Tris citrato, pH= 6.5; D =Tris citrato, pH= 8; E= Tris citrato borato, pH= 8.2; CA=CAAMP, pH= 7.0. **P= Polimórfico, M= Monomórfico, -- sin actividad.

La designación de los alelos para cada uno de los loci polimórficos y resueltos en las especies (13) y subespecies (3) analizadas, se resume y representa a continuación:

La glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6pdh) es una enzima tetramérica que interviene en la utilización de la glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato. En peces teleósteos y usando acetato de nitrocelulosa como soporte, la enzima se reporta como polimórfica para hígado y músculo (Gauldie y Smith, 1978). Para las 13

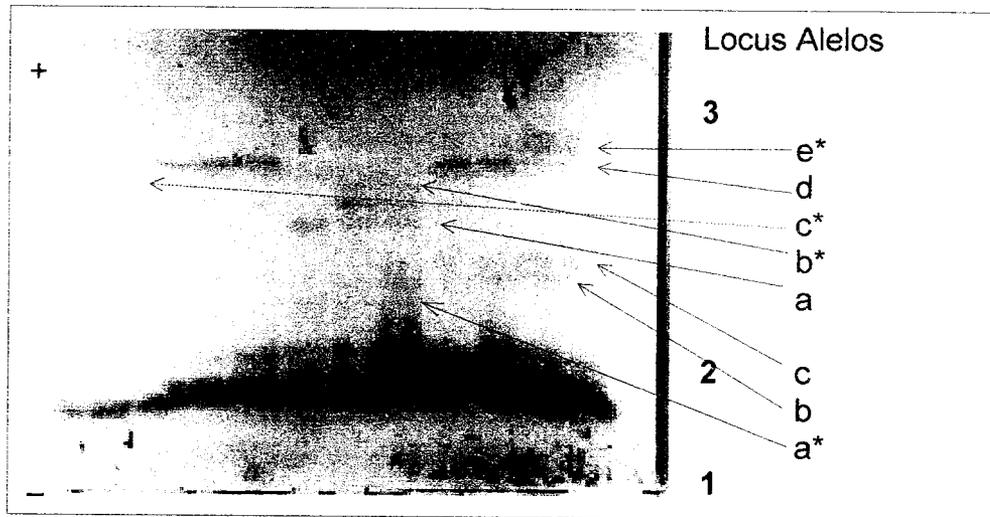
especies y 3 subespecies de *Chirostoma* se detectaron las dos zonas de actividad antes mencionada (Figura 23).

Figura 23. Zimograma del Sistema G6pdh, muestra los dos loci resueltos en las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma*.



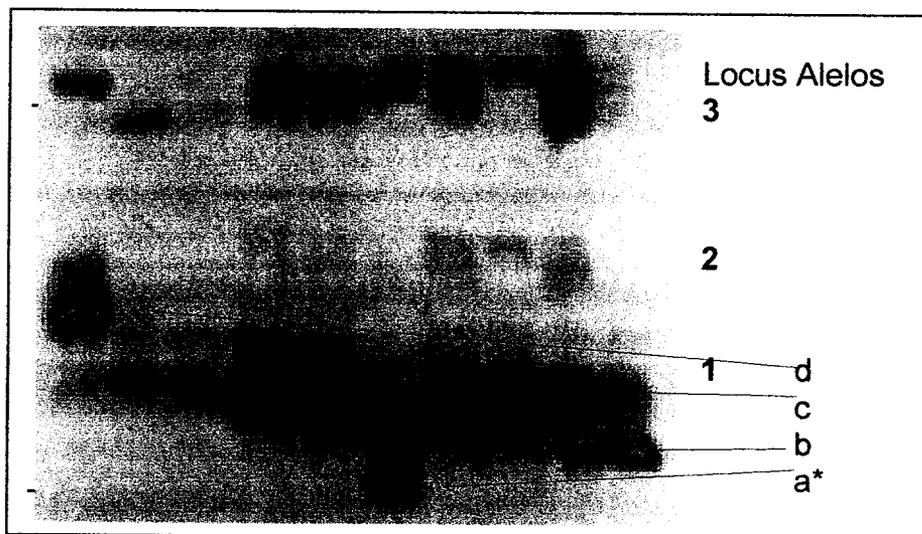
La enzima glucosa 6-fosfato isomerasa (Gpi) interviene en la glucólisis y se encuentra en el hígado y en el músculo (Murray *et al.* 1998). Es un dímero cuya actividad catalítica requiere de dos subunidades polipeptídicas, por lo que en los geles se observa un patrón de tres bandas, que refleja asociaciones diméricas entre los polipéptidos producidos por los dos alelos (Gauldie y Smith, 1978; Eguiarte, 1990). Dicho patrón se observa claramente en *Chirostoma*, en donde en los heterocigotos se presentan las tres bandas características de los dímeros (Figuras 24, 25 y 26).

Figura 24. Zimograma del Sistema Gpi. Se muestran los alelos de dos de los tres loci resueltos en las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma*.



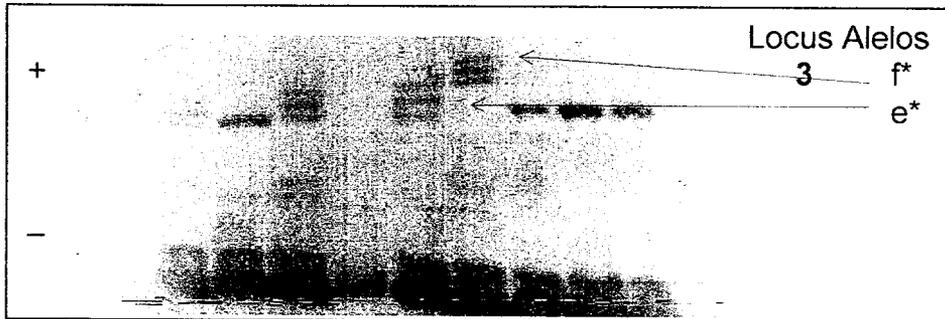
*individuos heterocigos

Figura 25. Zimograma del Sistema Gpi. Se muestran los alelos del primer locus resuelto en las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma*.



*individuos heterocigos

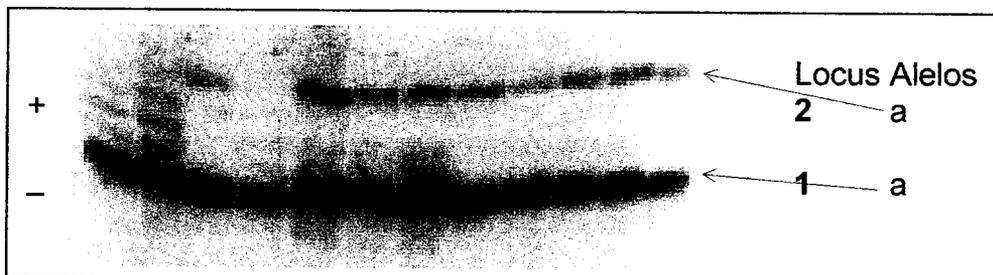
Figura 26. Zimograma del Sistema Gpi. Se muestran alelos del tercer locus resuelto en las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma*.



*Individuos heterocigos.

La enzima lactato deshidrogenasa (Ldh) es una enzima tetramérica que cataliza la conversión del piruvato a lactato y el NAD a NADH durante la glucólisis. En vertebrados se encuentra en el corazón, en el músculo esquelético y en hígado (Gillespie, 1991; Murray *et al.* 1998). En *Chirostoma* se detectaron dos zonas de actividad (hígado y músculo) (Figura 27).

Figura 27. Zimograma del Sistema Ldh. Se muestran los alelos de los dos loci resueltos en las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma*.



La enzima fosfoglucomutasa (PGM) interviene en el metabolismo del glucógeno y se encuentra en el hígado y en el músculo (Murray *et al.* 1998). Es un monómero, compuesto por un solo polipéptido con actividad catalítica por lo que un homócigo para el gen de la PGM muestra solo una banda en el gel, mientras que un heterócigo muestra un patrón de dos bandas correspondientes a los dos alelos (Figuras 28 y 29).

Figura 28. Zimograma del Sistema Pgm. Se muestran tres de los cuatro alelos resueltos en el único locus detectado en las 13 especies y 3 subespecies de *Chiostoma*.

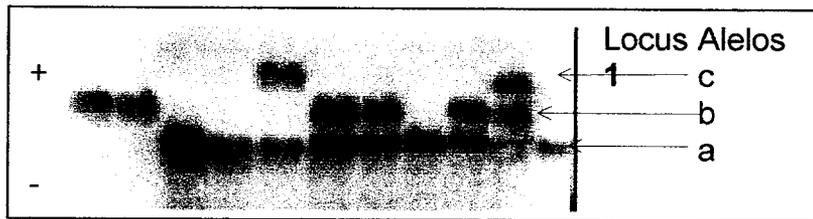


Figura 29. Zimograma del Sistema Pgm. Se muestra el cuarto alelo detectado en el único locus resuelto en las 13 especies y 3 subespecies de *Chiostoma*.



Frecuencias alélicas y variabilidad genética ($P_{.95}$, y H_e)

Se analizaron un total de 26 muestras, 16 correspondientes a las especies y subespecies del género y las otras 10 correspondientes a una, dos, tres o hasta cuatro muestras de una sola especie. Se estimaron las frecuencias alélicas de todas las muestras (26) y se sometieron a una prueba de significancia (P-Fisher, <0.05) para determinar si se debía considerar a estas como muestras o como especies. Los resultados indicaron que de las 10 muestras, solamente cinco presentaban diferencias significativas, por lo que en la tabla 27 se muestran las frecuencias alélicas de los loci polimórficos con el criterio de polimorfismo del 99% para las 13 especies y tres subespecies y para cinco muestras de *Chirostoma* analizadas.

Para la mayoría de las especies los loci 1, 2 y 3 de Gpi y el locus 1 de Pgm fueron polimórficos; los loci 1 y 2 de G6pdh fueron polimórficos sólo para la especie *C. promelas*, mientras que la especie *C. grandocule* presentó polimorfismo en el locus 2, para el resto de las especies se resolvieron frecuencias fijas para uno y otro alelo. El locus 1 de Ldh se resolvió como polimórfico solamente para una muestra de *C. grandocule*, mientras que el locus 2 de la misma enzima fue polimórfico para las especies *C. grandocule*, *C. estor* y *C. lucius* (ver Tabla 27). Por otro lado, los loci de las enzimas Adh, 6Gpdh, Gpdh, Gcdh, He, Hbd, Idh, Mdh y Xdh fueron todos monomórficos en todas las muestras.

Para un criterio de polimorfismo del 99%, el número promedio de loci polimórficos para las 13 especies y tres subespecies (21 muestras/poblaciones) fue del 20.5%.

Los valores elevados que se observaron en las muestras de la especie *C. grandocule* se deben a que en esta especie sólo se trabajó con 11 loci, mientras que para el resto de las especies se trabajó con los 23 loci. El valor promedio de H_e para las mismas muestras, estimación considerada como la menos influenciada por el número de muestra (Gillespie, 1991), debido a su importancia biológica y a que implica varios factores evolutivos (Hedrick y Gilpin, 1997) fue de 0.063. Estos valores son ligeramente mayores a los reportados por Nevo (1978) para peces (15.2 y 0.051 para P al 95% y para H_e , respectivamente), por Echelle y Echelle (1984) para especies del género *Chirostoma* (16.38% y 0.044, para P al 95% y H_e , respectivamente) y similares a los reportados por Barriga-Sosa *et al.*, (2001 b) para las siete especies del grupo "*humboldtianum*" (14.4% y 0.060, para P y H_e , respectivamente). Las diferencias en P se pueden atribuir principalmente a las diferencias en el tamaño de muestra entre los estudios, como ha sido sugerido para otros estudios comparativos a niveles taxonómicos supra-genéricos (Gillespie, 1991) e inter o intra-específicos (Barriga-Sosa *et al.*, 2001 b y en prep.). Las diferencias en H_e por otro lado, pueden atribuirse a la diferencia en el número de enzimas analizadas y tipo de sistema utilizados. El efecto de loci específicos sobre la variabilidad puede estar determinado por el tipo de enzimas que se utilizan en los estudios: por ejemplo, el utilizar enzimas del Grupo I (enzimas que presentan un sustrato generado intracelularmente, como por ejemplo las enzimas glucolíticas y del ciclo del ácido cítrico, 6Gpdh, Gdh, Me) o utilizar enzimas del Grupo II (con posibilidades de orígenes múltiples y posiblemente extracelulares y no específicas, como por ejemplo las esterasas, fosfatasa, deshidrogenasas), afectará de forma

inequívoca la estimación de *H*. En, al menos, *Drosophila*, primates, roedores, reptiles y peces existe una correlación positiva entre el peso molecular de la subunidad y la heterocigosidad (Koehn y Eanes, 1978; Nei y Chakraborty, 1978; Brown y Langley, 1979). Además, otros factores biológicos podrían ser importantes para explicar las diferencias encontradas. Entre dichos factores biológicos podrían encontrarse, la hibridación, ya que este evento entre “especies” del género *Chirostoma* ha sido sugerido desde los años 1950's por varios autores (Hubbs y Drewry, 1959; Barbour y Chernoff, 1984; Toledo, 1987) y demostrado experimentalmente por otros (Pérez, 1987; Andrade, 1990; Estrada, 1991; Alaye 1993 a y b). La hibridación se asocia con la introducción de huevos no identificados en diferentes cuerpos de agua (Toledo, 1987, Alaye, 1993 a y b). Por ello es importante señalar que aunque los organismos incluidos en el presente estudio (básicamente los de los Lagos Pátzcuaro, Chapala y Zirahuén) son solamente aquellos que fueron debidamente identificados con caracteres morfométricos y merísticos, no se descarta la posibilidad de que algunos de los organismos identificados sean producto de hibridaciones naturales o introgresiones (la cruce de híbridos, F_1 con especies progenitoras). La hibridación e hibridación introgresiva son comunes en peces (Hubbs, 1955; Crabtree y Buth, 1987; Campton, 1987; Verspoor y Amar, 1991) y han sido documentadas para varias especies de aterínidos (Hubbs y Drewry, 1959), y verificadas electroforéticamente en catostomidos (Crabtree y Buth, 1987), tilapia (Gregg *et al.*, 1998) y salmonidos (Crozier, 1984; Nyman, 1970; Jansson y Öst, 1997) entre otros. En aterinópsidos del género *Chirostoma*, la información al respecto es escasa y solamente se restringe a estudios realizados por Rincón (1992), Alaye (1996 a y b), quienes utilizan la

molécula de la hemoglobina para discriminar especies del Lago de Pátzcuaro a partir del número e intensidad de las bandas aparecidas en el patrón electroforético. Sin embargo, los resultados no son convincentes y es imperativo que se lleven a cabo estudios más detallados con progenitores y descendencia procedente de híbridos artificiales, para poder comprobar dicha hipótesis.

Variación inter-específica.

Algunas de las especies se diferenciaron por presentar alelos raros y otras por ser las únicas en presentar determinado alelo (alelos fijos) (Tabla 27). Por ejemplo, la especie *C. promelas* fue la única en presentar el alelo *b* de los loci G6pdh-1 y 2, mientras que en la especie *C. grandocule* apareció polimorfismo solamente en el locus 2 y no se detectó actividad en el locus 1. La falta de actividad en este locus y su presencia en la especie pudo deberse a la limitación en la disponibilidad de tejido hepático de buena calidad, ya que esta enzima se degrada cuando se homogeniza en ausencia de NADP. Las especies *C. grandocule*, *C. humboldtianum* y *C. jordani* fueron las únicas de las 16 especies incluidas en esta tesis que presentaron el alelo *d* del locus Gpi-1. *Chirostoma grandocule*, *C. humboldtianum*, *C. e. estor* y *C. lucius* presentaron el alelo *d* para el locus Gpi-3. Solamente *C. humboldtianum* y *C. lucius* presentaron el alelo *e* en el mismo locus y *C. humboldtianum* fue la única especie en presentar el alelo raro *f* en el mismo locus. La especie *C. grandocule* también se diferencia del resto por presentar el alelo raro *b* en los loci Ldh-1 y 2, y las especies *C. e. estor* y *C. lucius* por ser polimórficas para el locus Ldh-2. *C. grandocule* y *C.*

jordani además se caracterizaron por presentar el alelo raro *a* del locus Pgm al igual que *C. riojai* y *C. labarcae*.

Las especies que presentaron los valores de heterocigosidad más elevados fueron *C. jordani* (0.096) y *C. e. copandaro* (0.094), seguidas por *C. humboldtianum* (promedio, 0.085), *C. e. estor* (promedio, 0.083), *C. labarcae* (0.082), *C. patzcuaro* (0.078), *C. chapalae* (0.076), *C. promelas* (0.073) y *C. sphyraena* (0.070). Las especies *C. riojai*, *C. c. consocium*, *C. a. attenuatum*, *C. c. reseratum*, *C. a. zirahuen* y *C. lucius* presentaron heterocigosidad intermedia (ver Tabla 27) mientras que la heterocigosidad más baja se observó en la especie *C. grandocule* (0.022). En general, estos valores son más elevados que los reportados por Echelle y Echelle (1984) (Tabla 28). Lo que, como ya se mencionó puede estar relacionado con el tipo de enzimas utilizadas en cada uno de los trabajos. En el presente trabajo las enzimas que presentaron variabilidad fueron solamente Gpi y Pgm (enzimas del grupo II), mientras que en el trabajo de Echelle & Echelle (op cit.) además de estas enzimas (Gpi y Pgm) se presentó variabilidad en Ak, Aat, Ck, Gpdh, Es, 6Pgd, Ipo y Ldh (enzimas del grupo I y II). También podría influir en los datos, la existencia de hibridación, tanto natural como artificial que ocurre en los lagos de Pátzcuaro y Chapala.

Tabla 27. Frecuencias alélicas de los loci enzimáticos polimórficos en las 21 muestras de 13 especies y tres subespecies del género *Chirostoma* analizadas. El número de muestra analizado para cada locus se encuentra en paréntesis.

Locus	GJ96	GI97	GJ99	Prom	Hum	HPTz	EPTz	ECha	EcC	LucM
GPI1	(96)	(99)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	0.005	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.953	0.990	0.983	0.333	0.725	0.350	0.854	0.375	0.625	1.000
c	0.037	0.010	0.000	0.667	0.225	0.417	0.146	0.625	0.375	0.000
d	0.005	0.000	0.006	0.000	0.050	0.233	0.000	0.000	0.000	0.000
GPI2	(96)	(99)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	0.005	0.056	0.006	0.000	0.300	0.700	0.583	0.000	0.000	0.000
b	0.984	0.934	0.994	0.333	0.550	0.300	0.375	0.375	0.625	1.000
c	0.011	0.010	0.000	0.667	0.150	0.000	0.042	0.625	0.375	0.000
GPI3	(96)	(99)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	0.005	0.000	0.006	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.625	0.000
b	0.985	0.985	0.988	0.958	0.825	0.750	0.937	1.000	0.375	1.000
c	0.005	0.015	0.000	0.000	0.125	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
d	0.005	0.000	0.006	0.000	0.000	0.167	0.063	0.000	0.000	0.000
e	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
f	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G6PDH1	(96)	(75)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	0.000	0.000	0.000	0.458	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
b	0.000	0.000	0.000	0.542	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
G6PDH2	(96)	(75)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	1.000	0.909	1.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.000	0.091	0.000	0.917	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LDH1	(96)	(75)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	1.000	1.000	0.988	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
b	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LDH2	(96)	(75)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	0.969	0.995	0.988	1.000	1.000	1.000	0.938	1.000	1.000	0.857
b	0.031	0.005	0.012	0.000	0.000	0.000	0.062	0.000	0.000	0.143
PGM	(96)	(99)	(87)	(12)	(20)	(30)	(24)	(8)	(4)	(7)
a	0.010	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.985	1.000	0.971	0.000	0.000	0.000	0.167	0.250	0.000	0.000
c	0.005	0.000	0.023	1.000	0.975	1.000	0.833	0.688	1.000	1.000
d	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.062	0.000	0.000
P_{99}	45.4	36.4	36.4	21.7	21.7	17.4	26.1	17.4	17.4	8.7
H_e	0.022	0.032	0.013	0.073	0.083	0.087	0.079	0.088	0.094	0.035

Cont. Tabla 27

Locus	LucC	Con	Cre	Att	Azi	Jor	Cha	Rio	Lab	Sph	Ptz
GPI1	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	0.000	0.025	0.000	0.941	0.000	0.075	0.000	0.767	0.000	0.000	0.000
b	0.167	0.275	0.125	0.059	1.000	0.000	0.219	0.233	0.167	0.400	0.833
c	0.833	0.700	0.875	0.000	0.000	0.900	0.781	0.000	0.833	0.600	0.167
d	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
GPI2	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	0.000	0.300	0.000	0.000	0.500	0.075	0.188	0.900	0.000	0.000	0.000
b	0.278	0.700	0.375	0.941	0.500	0.525	0.812	0.100	0.167	0.400	0.833
c	0.722	0.000	0.625	0.059	0.000	0.400	0.000	0.000	0.833	0.600	0.167
GPI3	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.778	1.000	1.000	0.971	1.000	0.250	0.969	0.867	1.000	1.000	1.000
c	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.750	0.031	0.133	0.000	0.000	0.000
d	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
e	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
f	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G6PDH	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
b	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
G6PDH	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LDH1	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LDH2	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PGM	(9)	(20)	(8)	(17)	(20)	(20)	(16)	(15)	(3)	(5)	(3)
a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.075	0.000	0.067	0.167	0.000	0.000
b	0.000	0.000	0.000	0.588	1.000	0.300	0.562	0.000	0.000	1.000	0.667
c	1.000	1.000	1.000	0.324	0.000	0.600	0.438	0.933	0.667	0.000	0.333
d	0.000	0.000	0.000	0.088	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
$P_{.99}$	13.0	13.0	13.0	21.7	8.7	21.7	21.7	21.7	17.4	13.0	17.4
H_e	0.049	0.060	0.055	0.059	0.044	0.096	0.076	0.063	0.082	0.070	0.078

Se considera a un locus polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede el 99%. GJ96= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1996); GI97= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Ichupio-1997); GJ-99= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1999); Prom= *C. promelas*; Hum= *C. humboldtianum* (6, Lago de Chapala; 6 Lago de Zirahuén y 8, Laguna Zacapú); EcC= *C. e. copandaro*; Cre= *C. c. reseratum*; Att= *C. a. attenuatum*; Azi= *C. a. zirahuén*; Jor= *C. jordani*; Cha= *C. chapalae*; Rio= *C. riojai*; Lab= *C. labarcae* y Ptz= *C. patzcuaro*.

Tabla 28. Variabilidad genética de 23 loci enzimáticos en 12 especies y una subespecie con los datos de frecuencias alélicas tomados de Echelle y Echelle (1984). El error estándar se encuentra en paréntesis.

Especies	No.	A	$P_{.95}$	H_e
<i>C. grandocule</i>	10	1.1 (0.1)	8.7	0.009 (0.006)
<i>C. promelas</i>	8	1.1 (0.1)	8.7	0.028 (0.023)
<i>C. humboldtianum</i>	10	1.2 (0.1)	21.7	0.026 (0.011)
<i>C. e. estor</i>	10	1.3 (0.1)	26.1	0.083 (0.036)
<i>C. lucius</i>	31	1.1 (0.0)	4.3	0.013 (0.012)
<i>C. c. consocium</i>	30	1.2 (0.1)	17.4	0.049 (0.026)
<i>C. c. reseratum</i>	28	1.1 (0.1)	8.7	0.015 (0.009)
<i>C. a. attenuatum</i>	12	1.0 (0.0)	4.4	0.014 (0.014)
<i>C. jordani</i>	17*	1.2 (0.1)	14.8	0.052 (0.029)
<i>C. chapalae</i>	25	1.3 (0.1)	26.1	0.124 (0.061)
<i>C. riojai</i>	23	1.5 (0.2)	17.4	0.087 (0.042)
<i>C. labarcae</i>	13	1.2 (0.1)	4.4	0.028 (0.018)
<i>C. sphyraena</i>	30	1.1 (0.1)	8.7	0.022 (0.014)

N= tamaño de muestra; *promedio de cinco poblaciones; A = promedio de alelos por locus. Un locus se considera polimorfo (P) si la frecuencia del alelo más común no excede de 0.95.

Variación Intra-específica.

A nivel intra-específico, se observaron diferencias en las frecuencias alélicas (Tabla 29) y en la variación genética (H_e) entre muestras. Por ejemplo, las muestras GJ-96 y GI-97 de la especie *C. grandocule* presentaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y en la H_e entre sitios y entre años, respectivamente. Barriga-Sosa *et al.* (2001 b y en prep.) han reportado estas diferencias sugiriendo una diferenciación genética real entre las muestras de Janitzio (GJ-96 y GJ-99) e Ichupio (GI-97). Los mismos autores reportaron que los loci Gpi-1, 2 y 3 de la muestra GJ-99, no presentan el alelo *c* observado en la muestra GJ-96. Y que la muestra GI-97 no presentó los alelos *a* y *d* en los loci Gpi-1 y 3. Los autores también reportan alelos fijos entre años y entre sitios, por ejemplo el alelo *a* en el locus Ldh-1 para GJ-96 esta fijado y para GJ-99 el mismo alelo en el locus Ldh-2, o entre sitios, para las muestras de Janitzio el alelo *a* en el locus G6pdh-2 esta fijado y para la muestra de Ichupio el alelo *b* en el locus Pgm. También se reportan diferencias significativas en las frecuencias alélicas de todos los loci, excepto para Gpi-3 ($P= 0.0906$) y Ldh-1 ($P= 0.0955$).

Se observan diferencias en las frecuencias alélicas también entre las muestras correspondientes a las especies *C. humboldtianum*, *C. e. estor* y *C. lucius*, diferencias reportadas y discutidas por Barriga-Sosa *et al.*, (2001 b). En dicho trabajo, se comparan dos poblaciones de *C. grandocule*, cuatro de *C. humboldtianum*, dos de *C. e. estor* y dos de *C. lucius* y los resultados genéticos son apoyados con datos morfométricos y merísticos. Los autores sugieren que la

variabilidad observada entre las poblaciones de las últimas tres especies esta relacionada con el aislamiento geográfico de las poblaciones analizadas. Por ejemplo, el lago de Zirahuén se caracteriza por ser un cuerpo de agua relativamente estable, joven y con aguas homogéneas en el que se encuentran solamente dos especies del género *Chirostoma* y en donde las prácticas de pesca se reducen a la pesca deportiva de otras especies de peces que se encuentran en el lago. En base a esto se explicaría que la muestra de la especie *C. humboldtianum* de ese lago presente la H_E más baja (H_{Zir} , 0.072 s. e. 0.036) observada en la especie. En contraste, los lagos de Pátzcuaro y Chapala son los más grandes, contaminados y erosionados y en ellos se encuentran la mayoría de las especies del género. La abundancia de otras especies de peces y la gran explotación pesquera sugeriría que el incremento en la H_E de estas poblaciones se puede explicar en base a que estos organismos se encuentran expuestos a mayores presiones selectivas (competencia por alimento, por espacio y presión pesquera).

Aunque se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las frecuencias alélicas entre algunas de las especies (Tabla 29), fueron más significativas las diferencias entre muestras de la misma especie. Las especies que no presentaron diferencias significativas fueron en su mayoría las especies del Lago de Chapala.

Tabla 29. Probabilidades combinadas (P-Fisher, diferencias en las frecuencias alélicas entre muestras) para cada par de muestras analizadas (26 muestras) correspondientes a 13 especies y tres subespecies.

M	GJ96	GI97	GJ99	Prom	Hum	HPtz	EPtz	ECha	EcC	LucM
GJ96	---									
GI97	0.0000	---								
GJ99	0.1418	0.0000	---							
Prom	0.0000	0.0000	0.0000	---						
Hum	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	---					
HPtz	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	---				
EPtz	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0000	---			
ECha	0.0000	0.0000	0.0000	0.7614	0.0017	0.0000	0.0002	---		
EcC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0056	0.0401	0.0000	0.0000	0.0021	---	
LucM	0.0001	0.0000	0.0000	0.0002	0.2198	0.0000	0.0340	0.0004	0.0019	---
LucC	0.0000	0.0000	0.0000	0.8898	0.0041	0.0161	0.0000	0.7470	0.0142	0.0004
Con	0.0000	0.0000	0.0000	0.0477	0.0037	0.0001	0.0001	0.0078	0.0001	0.0080
Cre	0.0000	0.0000	0.0000	0.9989	0.0026	0.0022	0.0001	0.8975	0.0031	0.0005
Att	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0002	0.0000	0.0696
Azi	0.0002	0.0003	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	0.0000	0.0005
Jor	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0005	0.0000	0.0000
Cha	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0246	0.0000	0.0001
Rio	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0018	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
Lab	0.0000	0.0000	0.0000	0.9939	0.1268	0.0265	0.0019	0.9976	0.1238	0.0120
Sph	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.4926	0.0770	0.0090	0.9995	0.2463	0.0478
Ptz	0.0000	0.0038	0.0004	0.0787	0.1429	0.0008	0.4291	0.8156	0.1035	0.4639

Cont. Tabla 29.

M	LucC	Con	Cre	Att	Azi	Jor	Cha	Rio	Lab	Sph	Ptz
LucC	---										
Con	0.0134	----									
Cre	0.9560	0.1700	----								
Att	0.0000	0.0000	0.0000	----							
Azi	0.0000	0.0002	0.0000	0.0002	----						
Jor	0.0000	0.0000	0.0052	0.0002	0.0000	----					
Cha	0.0000	0.0950	0.0011	0.0081	0.0000	0.0000	----				
Rio	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	----			
Lab	0.9989	0.0835	0.9991	0.0002	0.0000	0.1464	0.0300	0.0005	----		
Sph	0.9990	0.1799	0.9995	0.0000	0.0000	0.0012	0.0082	0.0006	0.9982	----	
Ptz	0.1208	0.0075	0.0515	0.9994	0.1440	0.0024	0.5905	0.0000	0.4567	0.3673	----

M = muestras; GJ96= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1996); GI97= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Ichupio-1997); GJ-99= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1999); Prom= *C. promelas*; Hum= *C. humboldtianum* (6, Lago de Chapala; 6 Lago de Zirahuén y 8, Laguna Zacapú); EcC= *C. e. copandaro*; Cre= *C. c. reseratum*; Att= *C. a. attenuatum*; Azi= *C. a. zirahuén*; Jor= *C. jordani*; Cha= *C. chapalae*, Rio= *C. riojai*; Lab= *C. labarcae* y Ptz= *C. patzcuaro*.

Se observó desviación en el equilibrio de H-W en la mayoría de las muestras y loci polimórficos (Tabla 30). El tamaño de muestra para la estimación de este parámetro es un factor importante, por lo que en el presente trabajo se cuestionaría su validez para varias de las muestras. Sin embargo, dichos valores se incluyen porque pueden ayudar a interpretar aspectos relacionados con el manejo de estos recursos de manera general. Los resultados significativos en las *C. estor* de Pátzcuaro (Eptz), *C. humboldtianum* de Zacapú (HZac), *C. promelas* (Prom), *C. attenuatum* (Att) y *C.*

riogai de Santiago Tilapa (RSt) se deben a un déficit de heterócigos en uno, dos o tres loci, por lo que no se descarta que exista una alta endogamia entre especies de los lagos de Pátzcuaro y Chapala. Para las muestras *C. sphyraena* (Sph), *C. a. zirahuen* (Azi) y *C. e. copandaro* de Chapala (EcC), los resultados significativos se deben a un exceso de heterócigos, debido probablemente a cruzamiento externo (hibridación) entre estas especies en los lagos de Zirahuén, Pátzcuaro y Chapala. Los promedios indican que la endogamia es mayor en *C. lucius* de Chapala (LCha), *C. attenuatum* (Att) y *C. riogai* de Santiago Tilapa (RSt), seguidas por *C. consocium* (Con), *C. jordani* de Cuitzeo (JCtz) y *C. c. reseratum* de Chapala (CrCha) y el cruzamiento externo es mayor en *C. a. zirahuen* (Azi), *C. e. copandaro* de Chapala (EcC) y *C. sphyraena* Sph.

También se encontraron desviaciones en el equilibrio de H-W en las tres muestras de *C. grandocule*. Los resultados, significativos en ambos años y sitios, se debieron a una deficiencia de heterócigos en todos los loci en una u otra muestra, lo que sugiere una fuerte endogamia (especialmente en la muestra GI-97). Estos resultados se ven posteriormente apoyados por el análisis de los estadísticos-F, que indican, que en promedio, el jackknifed-*f* sugiere endogamia en las muestras (0.3838, s.D. 0.1335) (Barriga-Sosa *et al.*, en prep).

Tabla 30. Índices de fijación (valores de probabilidad asociados con el coeficiente de entrecruzamiento de Weir & Cockerham, 1984) para cada muestra y loci polimórfico.

.M	Gpi-1	Gpi-2	Gpi-3	G6pdh2	Ldh1	Ldh2	Pgm	Prom F
GJ96	-0.0345	0.6655*	-0.0291	-----	-----	-0.0270	0.2287*	+0.1607
GI97	+1.000	0.2705*	0.6644*	0.7577*	-----	-----	-----	+0.5385*
GJ99	-0.0078	-----	-0.0029	-----	1.0000	-----	0.3901*	+0.3966*
Prom	-0.095*	-0.095*	-----	+0.500*	-----	-----	-----	+0.103
HPtz	-0.267*	+0.223*	+0.106*	-----	-----	-----	-----	+0.021
EPtz	-0.150*	+1.000	-0.045*	-----	-----	-----	-0.179*	+0.156
ECha	+0.000*	+0.000*	-----	-----	-----	-----	-0.296*	-0.099
EcC	-0.600	-0.600	-0.600	-----	-----	-----	--	-0.600*
Lab	-0.200	-0.200	-----	-----	-----	-----	-0.200	-0.200
LucC	+0.636*	+0.636*	-----	-----	-----	-----	-----	+0.636*
LucM	-----	-----	-----	-----	-----	-0.091*	-----	-0.091
Sph	-0.600*	-0.600*	-----	-----	-----	-----	-----	-0.600*
Rio	+0.341	-0.176	+1.000	-----	-----	-----	+1.000	+0.541*
Con	+0.103*	+0.073*	-----	-----	-----	-----	-----	+0.088
Cre	-0.143	+0.467	-----	-----	-----	-----	-----	+0.162
Att	+1.000	+1.000	-0.030	-----	-----	-----	0.674	+0.661*
Azi	-----	-1.000	-----	-----	-----	-----	-----	-1.000
Jor	-0.143	-1.000	-0.600	-----	-----	-----	-0.143	-0.019
Cha	+0.086	+0.179	-0.032	-----	-----	-----	+1.000	+0.308*
Ptz	-0.200	-0.200	-0.500	-----	-----	-----	-----	-0.300*

M = muestras; GJ96= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1996); GI97= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Ichupio-1997); GJ-99= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1999); Prom= *C. promelas*; Hum= *C. humboldtianum* (6, Lago de Chapala; 6 Lago de Zirahuén y 8, Laguna Zacapú); EcC= *C. e. copandaro*; Cre= *C. c. reseratum*; Att= *C. a. attenuatum*; Azi= *C. a. zirahuén*; Jor= *C. jordani*; Cha= *C. chapalae*, Rio= *C. riojai*; Lab= *C. labarcae* y Ptz= *C. patzcuaro*.

Diferenciación genética, Distancias y Análisis de conglomerados (UPGMA).

Estimaciones preliminares de los estadísticos-F de acuerdo con Weir y Cockerham para los organismos incluidos en el presente trabajo, aunque no significativas por el

número de individuos analizados, muestran que existe una diferenciación genética en las 13 especies y 3 subespecies (21 muestras) analizadas y apoyan los resultados morfométricos, merísticos y genéticos que sugieren entrecruzamiento y cruzamiento externo entre especies y subespecies. El promedio de jack-knifed θ_{POP} and θ_{SUBPOP} indican una diferenciación genética significativa entre especies y muestras (0.5672, s.D. 0.1316 y 0.6057, s.D 0.1165, respectivamente) (Tabla 31). Estos resultados apoyan a los reportados previamente para siete especies del género (Barriga *et al.*, 2001 b).

Para visualizar diferencias en las frecuencias alélicas entre especies, se obtuvo la estimación del coeficiente de coancestría (Reynolds *et al.*, 1983) para evaluar la distancia e identidad genética (D_c y I_c) entre las muestras. Dicha estimación no asume limitaciones con relación al número de poblaciones, de muestras o frecuencias de heterocigotos (Weir & Cockerham, 1984). Los valores de identidad genética entre muestras/poblaciones de la misma especie fueron desde 0.008 para GJ-96/GJ-99 hasta 0.382 para *C. lucius* de Michoacán y de Chapala (LucM/LucC). Mientras que para muestras entre diferentes especies las valores fluctuaron entre -0.016 y 0.327 para especies del Lago de Chapala. También se observaron valores negativos en algunas muestras, por ejemplo, en identidades se observaron valores desde -0.0323 para *C. c. reseratum* de Chapala y *C. labarcae* (CreCha/Lab) hasta -0.0823 para *C. attenuatum* y *C. patzcuaro* (Att/Ptz), y en distancias desde -0.0317 hasta -0.0791 para las mismas muestras (Tabla 32). Esto sugeriría que las muestras

no son lo suficientemente distantes como para ser consideradas entidades independientes, resultados que sin embargo deben de ser manejados cuidadosamente ya que el tamaño de muestra utilizados en estos casos es muy reducido y afecta directamente a este estimador.

Tabla 31. a) Valores de F , θ_s y θ_p para cada loci polimórfico; b) Estimadores de la heterogeneidad genética (Weir & Cockerham 1984) θ , f y F en las 11 muestras (6 especies y 3 subespecies del género in *Chirostoma*).

a)				b)			
Enzima	θ_s	θ_p	f	θ_s	θ_p	f	F
Gpi-1	0.6058	0.5333	0.6027	0.6057	0.5672	0.5487	-0.1878
Gpi-2	0.5114	0.4100	0.5393	(0.1165)	(0.1316)	(0.2128)	(0.2753)
Gpi-3	0.4557	0.4432	0.5161	0.7428*	0.7312*	0.8001*	0.2211*
G6pdh-1	0.3743	0.3650	-0.1138	0.4244	0.3806	0.1959	-0.4796
G6pdh-2	0.0145	0.0819	1.0000				
Ldh-1	-0.0424	-0.0381	1.0000				
Ldh-2	0.0247	-0.0255	-0.0129				
Pgm	0.8452	8457	0.9048				

*90% Intervalo de confianza superior e inferior con 1,000 replicas de bootstrap en paréntesis.

Tabla 32. Coeficiente de Distancias (arriba) e Identidades genéticas (abajo) (Reynolds *et al.*, 1983) para 11 muestras/poblaciones de *Chirostoma*.

M	GJ96	GI97	GJ99	Prom	Hum	HPtz	EPtz	ECha	EcC	LucM
GJ96	---	0.037	0.008	1.863	1.303	1.402	1.200	1.589	1.709	1.687
GI97	0.036	---	0.043	1.661	1.158	1.289	1.049	1.380	1.518	1.412
GJ99	0.008	0.042	---	2.055	1.381	1.453	1.264	1.793	1.874	1.983
Prom	0.845	0.810	0.872	---	0.173	0.239	0.302	0.000	0.248	0.479
Hum	0.728	0.686	0.749	0.159	---	0.099	0.040	0.156	0.153	0.109
HPtz	0.754	0.725	0.766	0.213	0.095	---	0.110	0.239	0.275	0.372
EPtz	0.699	0.649	0.717	0.261	0.039	0.104	---	0.244	0.281	0.199
ECha	0.786	0.748	0.833	0.000	0.145	0.213	0.217	---	0.246	0.431
EcC	0.819	0.780	0.846	0.219	0.142	0.240	0.245	0.218	---	0.326
LucM	0.815	0.757	0.862	0.381	0.103	0.310	0.181	0.350	0.278	---
LucC	0.847	0.811	0.875	-0.024	0.146	0.200	0.249	0.007	0.187	0.382
Con	0.800	0.766	0.825	0.165	0.118	0.121	0.203	0.167	0.265	0.310
Cre	0.878	0.844	0.908	-0.016	0.229	0.237	0.332	0.025	0.294	0.513
Att	0.482	0.381	0.522	0.424	0.239	0.388	0.244	0.307	0.362	0.237
Azi	0.564	0.434	0.613	0.582	0.419	0.461	0.325	0.475	0.552	0.558
Jor	0.793	0.767	0.812	0.269	0.322	0.312	0.407	0.225	0.301	0.481
Cha	0.688	0.639	0.727	0.268	0.247	0.260	0.279	0.152	0.327	0.381
Rio	0.862	0.829	0.883	0.425	0.287	0.139	0.257	0.410	0.437	0.525
Lab	0.888	0.850	0.923	-0.025	0.241	0.252	0.322	-0.048	0.286	0.563
Sph	0.859	0.817	0.896	-0.063	0.093	0.173	0.205	-0.038	0.184	0.361
Ptz	0.566	0.428	0.662	0.313	0.162	0.308	0.169	0.149	0.268	0.266

Cont. Tabla 32.

M	LucC	Con	Cre	Att	Azi	Jor	Cha	Rio	Lab	Sph	Ptz
GJ96	1.877	1.611	2.100	0.657	0.829	1.574	1.165	1.981	2.192	1.960	0.834
GI97	1.667	1.453	1.858	0.479	0.568	1.458	1.019	1.771	1.899	1.698	0.558
GJ99	2.081	1.744	2.381	0.737	0.950	1.672	1.298	2.144	2.564	2.259	1.084
Prom	-0.023	0.181	-0.016	0.552	0.873	0.314	0.312	0.553	-0.024	-0.061	0.375
Hum	0.157	0.126	0.261	0.274	0.544	0.388	0.284	0.339	0.276	0.098	0.176
HPtz	0.223	0.129	0.270	0.490	0.617	0.374	0.301	0.215	0.291	0.190	0.369
EPtz	0.286	0.227	0.404	0.280	0.393	0.523	0.328	0.297	0.389	0.229	0.186
ECha	0.8	0.183	0.025	0.366	0.645	0.254	0.165	0.528	-0.047	-0.037	0.162
EcC	0.206	0.308	0.348	0.449	0.802	0.358	0.397	0.574	0.338	0.203	0.312
LucM	0.482	0.371	0.719	0.270	0.816	0.655	0.480	0.745	0.827	0.448	0.309
LucC	---	0.223	0.014	0.549	0.870	0.281	0.338	0.537	-0.19	-0.049	0.355
Con	0.199	---	0.176	0.491	0.814	0.377	0.172	0.477	0.292	0.127	0.385
Cre	0.014	0.161	---	0.694	1.055	0.289	0.301	0.654	-0.032	-0.027	0.537
Att	0.423	0.388	0.500	---	0.252	0.601	0.286	0.776	0.659	0.492	-0.08
Azi	0.581	0.557	0.652	0.222	---	0.812	0.494	0.870	0.986	0.878	0.185
Jor	0.245	0.314	0.251	0.451	0.556	---	0.288	0.617	0.241	0.293	0.427
Cha	0.287	0.158	0.259	0.248	0.390	0.250	---	0.611	0.296	0.263	0.131
Rio	0.416	0.379	0.480	0.539	0.581	0.460	0.457	---	0.633	0.531	0.678
Lab	-0.019	0.253	-0.032	0.483	0.627	0.214	0.257	0.469	---	-0.26	0.411
Sph	-0.051	0.119	-0.027	0.389	0.584	0.254	0.232	0.412	-0.026	---	0.302
Ptz	0.299	0.319	0.415	-0.082	0.169	0.348	0.123	0.492	0.337	0.261	----

M = muestras; GJ96= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1996); GI97= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Ichupio-1997); GJ-99= *C. grandocule* (Lago de Pátzcuaro, Janitzio-1999); Prom= *C. promelas*; Hum= *C. humboldtianum* (6, Lago de Chapala; 6 Lago de Zirahuén y 8, Laguna Zacapú); EcC= *C. e. copandaro*; Cre= *C. c. reseratum*; Att= *C. a. attenuatum*; Azi= *C. a. zirahuén*; Jor= *C. jordani*; Cha= *C. chapalae*; Rio= *C. riojai*; Lab= *C. labarcae* y Ptz= *C. patzcuaro*.

Las relaciones genéticas entre muestras, utilizando las distancias genéticas de coancestría (Reynolds *et al.*, 1983) y mínima de Nei (1972) y las frecuencias alélicas de ocho loci, resolvieron topologías muy similares. Ambos estimadores asumen que la estructuración de los grupos se debe principalmente a la deriva génica, aunque en el segundo se incluye también la mutación neutral de los loci. Las topologías generadas ilustran claramente las estrechas relaciones entre las muestras y apoya lo sugerido anteriormente sobre la reciente diversificación de las especies. El dendrograma (UPGMA) generado utilizando las distancias de coancestría muestra dos conglomerados. El principal presenta una dicotomía que refleja la separación de los dos grupos, Jordani y Arge, propuestos inicialmente por Barbour (1973 a y b). En el primer grupo se incluyen mayoritariamente las muestras representantes del grupo Jordani, con excepción de *C. labarcae* siendo apoyado con valores de bootstrap mayores del 80%. La ubicación de esta última especie en dicho conglomerado está relacionada con el limitado tamaño de muestra que se analizó, por lo que dicho resultado debe considerarse con precaución. El segundo grupo del mismo conglomerado contiene a las especies del grupo Arge, con excepción de la especie *C. chapalae*, y es apoyado con valores de bootstrap mayores al 70%. La especie *C. riojai* se encuentra equidistante entre los dos conglomerados. El segundo conglomerado lo conforman las poblaciones de la especie *C. grandocule* (Figura 30) y se muestra equidistante del resto de las especies. La separación de esta especie está relacionada con la baja variabilidad reportada para la especie en relación con el resto de las especies del género (Echelle y Echelle, 1984; Barriga-Sosa *et al.*, 2001 b). El índice de consistencia mostró que los nodos con valores de bootstrap mayores

del 50% son apoyados con el 47.8%, el 4.3% y el 8.7% de los loci polimórficos utilizados en el análisis.

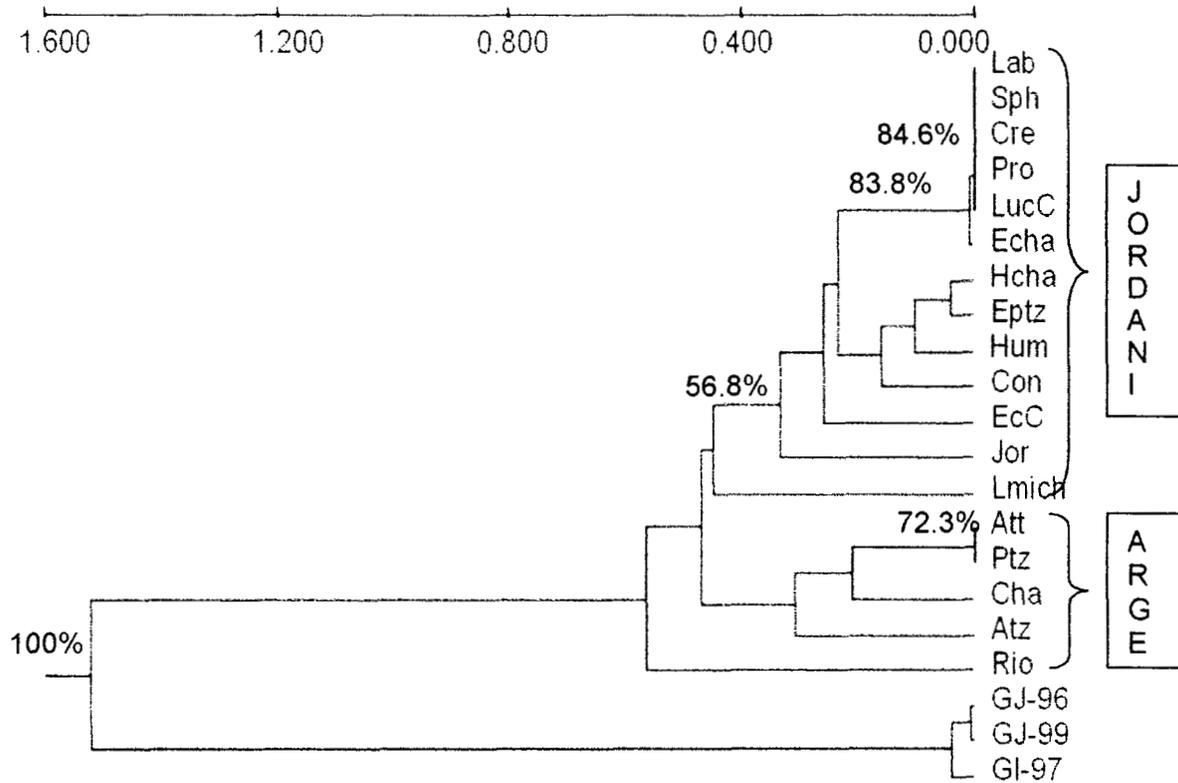


Figura 30. Dendrograma generado con 8 loci polimórficos, 13 especies y 3 subespecies (21 muestras): Att (*C. attenuatum attenuatum*), Azi (*C. c. zirahuen*), Con (*C. c. consocium*) Cre (*C. c. reseratum*), Cha (*C. chapalae*), ECha (*C. e. estor*, Chapala), Eptz (*C. e. estor*, Pátzcuaro), EcC (*C. e. copandaro*, Chapala), GJ-96 y 99 (*C. grandocule*, Janitzio 1996 y 1999), GI-97 (*C. grandocule*, Ichupio 1997), Jor (*C. jordani*), Lab (*C. labarcae*), LucC (*C. lucius*, Chapala), Lmich (*C. lucius*, Michoacán), Hum (*C. humboldtianum*), HCha (*C. humboldtianum* de Pátzcuaro), Pro (*C. promelas*), Sph (*C. sphyraena*), Rio (*C. riojai*), y Ptz (*C. patzcuaro*), por medio del coeficiente de coancestría (Reynolds *et al.* 1983). Se muestran valores de bootstrap mayores del 50%.

El árbol consenso generado por Neighbor-joining (N-J) y con las distancias de coancestría de Reynolds *et al.* (1983) (Figura 31) muestra una topología similar, con la separación de los dos grupos (Jordani y Arge). El conglomerado más numeroso es el que contiene a las especies del grupo Jordani, aunque aquí se presenta a la especie *C. riojai*, integrante del grupo Arge, estrechamente relacionada con *C. humboldtianum* (valores de bootstrap del 100% en este nodo), mientras que el conglomerado del grupo Arge incluye a la especie *C. sphyraena*. La mayoría de los nodos de este árbol presentan valores de bootstrap del 100%, incluyendo al nodo de las muestras de la especie *C. grandocule*, el cual se encuentra claramente separado de este último grupo. Es importante mencionar que un problema que se genera cuando se interpretan los valores de bootstrap asociados con los árboles de distancia genética es lo que se determina alta robustez artificial de los nodos, que puede generarse cuando se realiza el bootstrap entre un número limitado de loci y cuando se observa que el número de permutaciones posibles puede ser menor que el número de eventos de muestreo con reemplazo (en este caso 1000), dando como consecuencia una estimación artificial de la varianza muy pequeña (Felsenstein, 1995) . Por lo que realizar un muestreo con reemplazo un número elevado de veces y con un pequeño número de loci (en este caso 8), podría llevaros a una falsa interpretación de la robustez de los nodos. En el presente trabajo, los valores de bootstrap asociados con las muestras de *C. grandocule* y las de los grupos Jordani y Arge permanecieron constantes cuando se utilizó un menor número de replicas (200). Sin embargo los valores de las muestras *C. labarcae* y *C. riojai* sí variaron un poco.

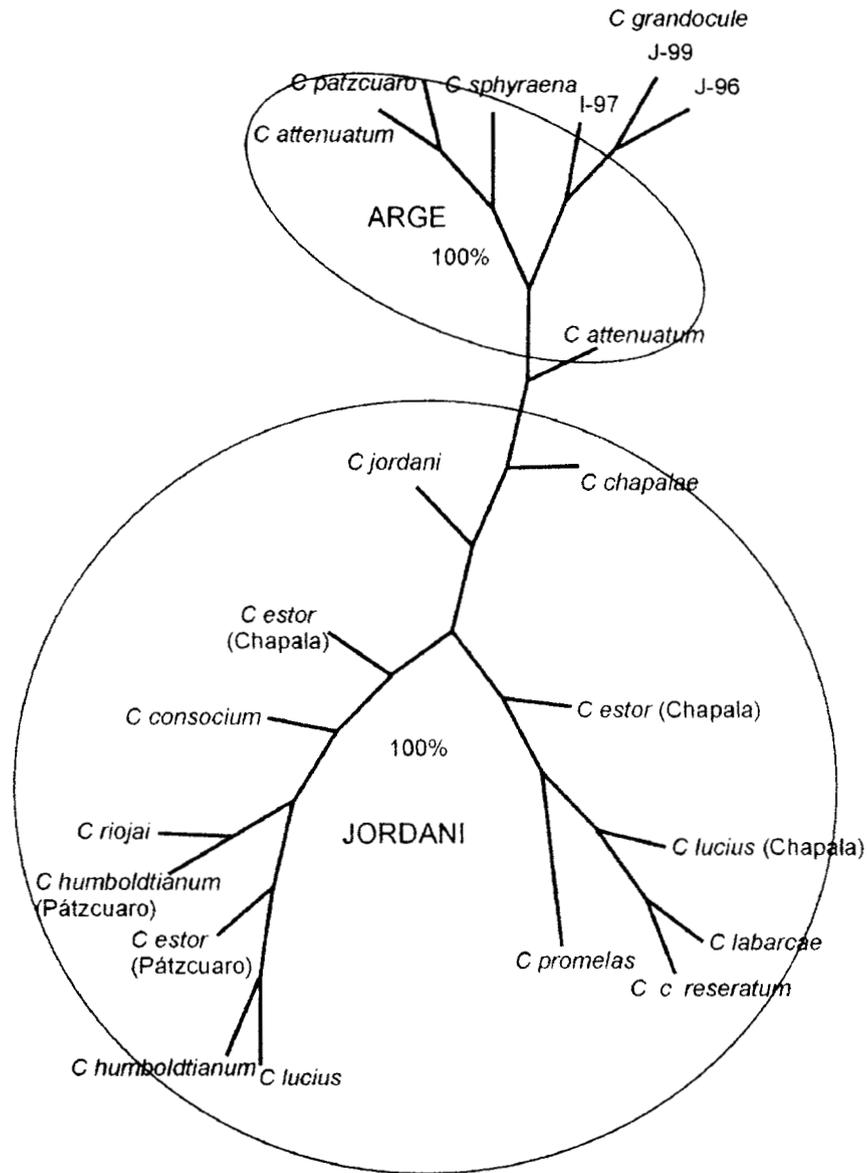


Figura 31. Arbol consenso generado por Neighbor joining con las frecuencias génicas de ocho loci polimórficos y 21 muestras del género *Chirostoma*.

Por otro lado, el cladograma generado con Máxima verosimilitud (ML) y con la opción CONTML de Phylip (Felsenstein, 1995) (Figura 32) muestra una topología muy similar a la de N-J, con el conglomerado más numeroso conteniendo a la mayoría de

las especies del grupo Jordani, de donde parecen desprenderse las especies *C. attenuatum* y *C. a. zirahuen* del grupo Arge. En este caso la especie *C. labarcae*, del grupo Arge se encuentra en dicotomía con *C. lucius* del lago de Chapala y *C. riojai* con *C. chapalae*. Nuevamente en este cladograma las muestras de la especie *C. grandocule* aparecen en la parte basal del clado, pero claramente diferenciadas del resto del grupo.

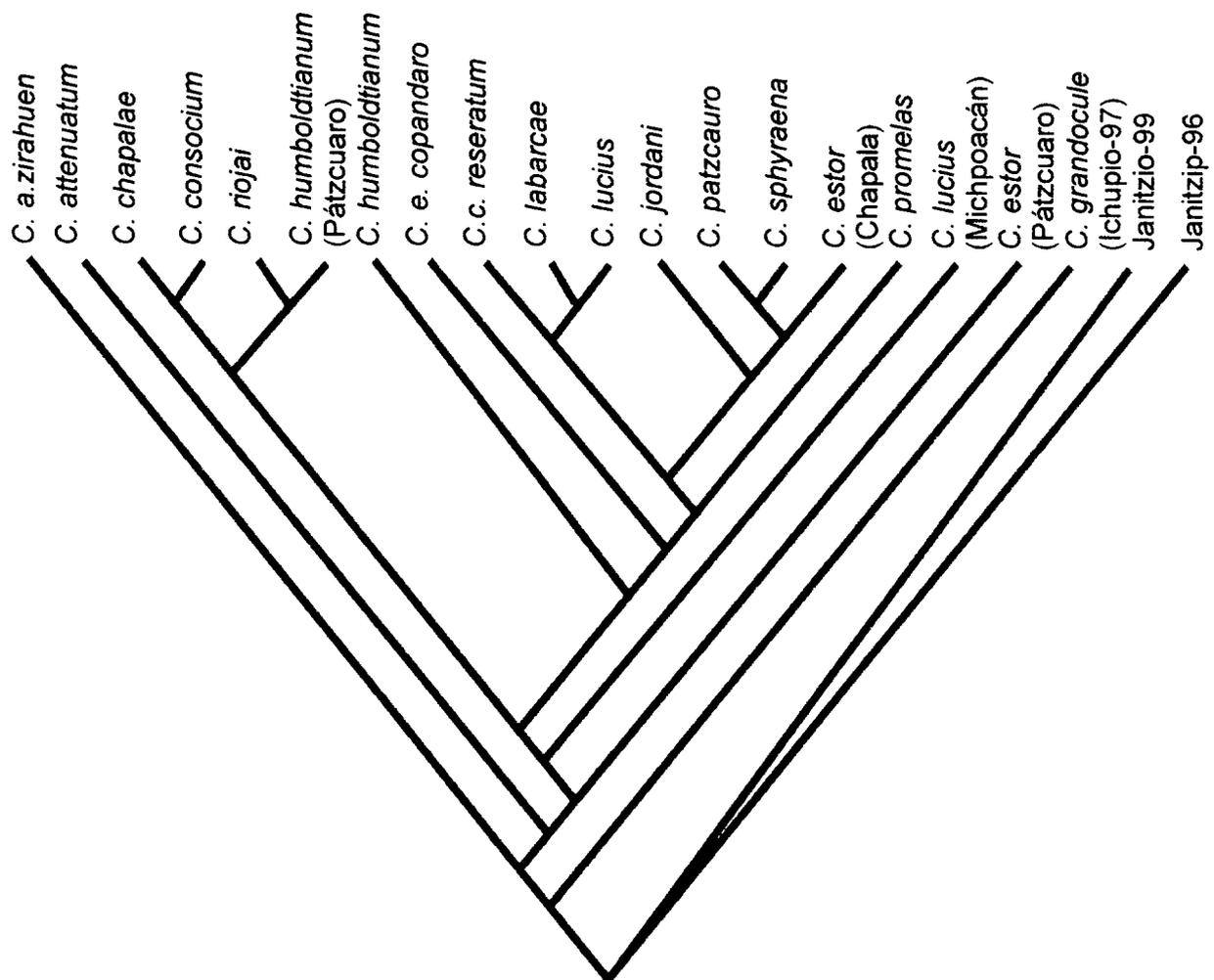


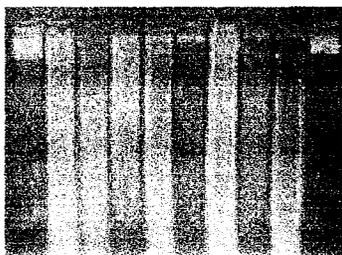
Figura 32. Cladograma generado con máxima verosimilitud (ML) con las frecuencias alélicas de ocho loci y utilizando la opción CONTML de PHYLIP (Felsenstein, 1995).

Análisis preliminar de los genes mitocondriales citocromo b y 16s rADN.

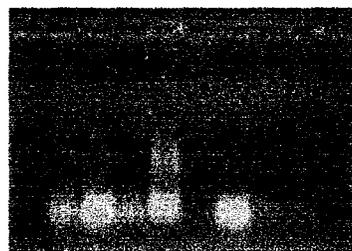
Amplificación vía PCR de fragmentos del cit B y 16S ADNr.

Las dos metodologías utilizadas para la extracción del tADN, Sambrook *et al.*, (1989), modificado por Barriga-Sosa *et al.*, (1995) y DNeasy™ de QIAGEN (Figura 33) fueron válidas a la hora de obtener ADNt de buena calidad para amplificar genes mitocondriales. Sin embargo, debido a que el tejido ha sido sometido a cambios bruscos de temperatura por fallas eléctricas y al tiempo de almacenamiento de dicho tejido (1996-2001), recientemente se observó una mejor calidad de ADNt extraído para algunas especies con el segundo de los métodos.

a) λ 1-2-3-4-5-6-7-8 λ



b) C⁺ 9-10-11-12-13-14-15-16 C⁺



Figuras 33. Extracciones de tADN con el método de Sambrook *et al.*, (1989) (a) para las especies *C. consocium* (1), *C. e. copandaro* (2), *C. attenuatum* (3), *C. promelas* (4), *C. sphyraena* (5), *C. grandocule* (6), *C. a. zirahuen* (7), *C. patzcuaro* (8) y con el método DNeasy™ de QUIAGEN (b) para las especies *C. estor* (9), *C. lucius* (10), *C. labarcae* (11), *C. riojai* (12), *C. grandocule* (13), *C. chapalae* (14), *C. humboldtianum* (15) y *C. jordani* (16). λ ladder = 2.5 ng. C⁺ tADN.

Los productos amplificados que se obtuvieron para el gen cit B fueron de aproximadamente 490 pares de bases (pb) usando el par de oligonucleótidos (cit B¹⁹⁵⁻¹⁹³). De aquí en adelante nos referimos a este fragmento como cit B-490.

Los fragmentos generados con los oligonucleótidos (Sar-Sbr) a partir del gen 16S ADNr fueron de aproximadamente 600 pb y a estos nos referimos en adelante como 16S-600. Los fragmentos cit B-490 obtenidos con ADNt extraído de acuerdo al método de Sambrook *et al.*, (1989), para las 16 especies en estudio se muestran en la Figura 34.

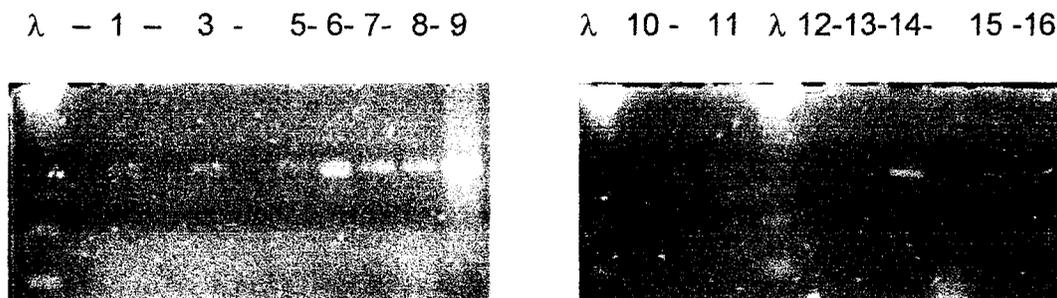


Figura 34. Amplificaciones del fragmento del gen cit B-490 para las especies *C. consocium* (1), *C. attenuatum* (3), *C. sphyraena* (5), *C. grandocule* (6), *C. a. zirahuen* (7), *C. patzcuaro* (8) *C. estor* (9), *C. lucius* (10), *C. labarcae* (11), *C. riojai* (12), *C. grandocule* (13), *C. chapalae* (14), *C. humboldtianum* (15) y *C. jordani* (16). λ ladder 100pb = 2.5ng.

Las amplificaciones para ambos genes cit B-490 y 16S-600 a partir del ADNt extraído con el método de DNeasy se muestran en la Figura 35.

16S-600 cit B-490

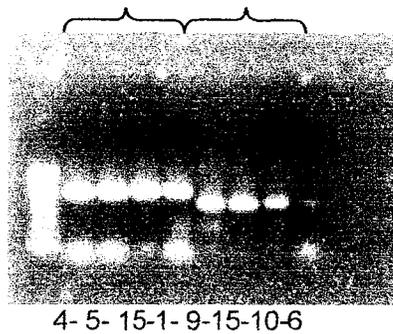


Figura 35. Amplificaciones de los fragmentos de los genes cit B-490 y 16S-600 para las especies *C. promelas* (4), *C. sphyraena* (5), *C. humboldtianum* (15), *C. consocium* (1), *C. estor* (9), *C. lucius* (10) y *C. grandocule* (6). λ ladder 100 pb = 2.5 ng.

Los productos amplificados, fueron purificados por los métodos de a) Volgelstein y Guillespie (1979), b) Amersham Life-Science y c) QUIAGEN y los resultados se muestran en la Figura 36. Aparecen bandas limpias y libres de ARNsA en los productos purificados por los tres métodos, aunque los dos primeros generaron interferencia en los procesos de secuenciación [aparentemente la matriz de fibra de vidrio utilizada en el método (1) y las enzimas hidrolíticas del método (2) inhiben la reacción de secuenciación (Ramos, Com. Per. y Pedroche Com. Per., respectivamente)]. El método que permitió obtener una mejor secuencia de nucleótidos fue el de QUIAGEN.

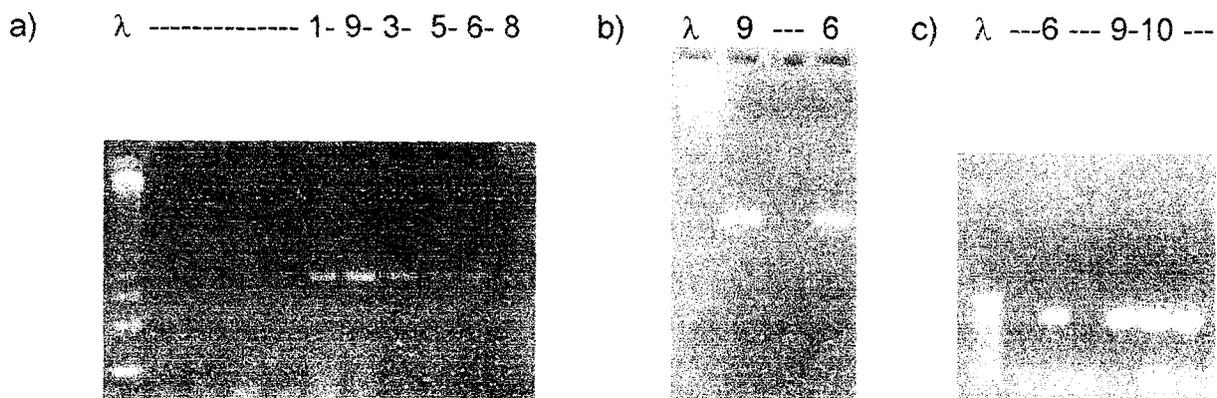


Figura 36. Fragmentos cit B-490 amplificados y purificados con el método a) Vogelstein y Gillespie (1979) a la izquierda, con el método b) Amersham Life Science al centro y el fragmento 16S-600 con el método c) QUIAGEN a la derecha. λ ladder 100 pb = 2.5 ng. Ver texto (página 151 y 152, Figs. 34 y 35) para referencia de especies.

Análisis de las Secuencias

La secuencia de nucleótidos compilada para los fragmentos cit B-490 de *C. estor*, *C. humboldtianum* y *C. lucius* además del 16S-600 de las especies *C. estor*, *C. lucius*, *C. humboldtianum*, *C. sphyraena*, *C. promelas* y *C. consocium* se sometieron a un análisis de alineamiento (BLASTN, Altschul *et al.*, 1997; Blast 2 sequences, Tatusova y Madden, 1999). El promedio del porcentaje de identidad en el alineamiento de 427 pb del cit B de las especies mencionadas fue del 79.8% y para 661 pb del 16S ADNr fue del 88.6%, ambos con relación a los mismos genes en genomas mitocondriales de organismos eucariontes. Dichos valores son considerados como significativos en la búsqueda de homología (Altschul *et al.*, 1997, Tatusova y Medden, 1999). Las

secuencias de cada gen también se alinearon de manera manual con el programa ESEE (Cabot y Beckenbach, 1992).

Fragmento del gen citocromo B

El fragmento cit B-490 de *Chirostoma* corresponde a la parte inicial del gen (posición 11 a 489 de la secuencia de nucleótidos y posición 4 a 140 de la secuencia de amino ácidos del mismo gen en el pez teleósteo *Cyprinus carpio*). Dicha secuencia (420 bp) representa un 36.8% del gen de acuerdo al tamaño promedio del gen reportado para peces teleósteos (Figura 37).

Para comparar la secuencia del Cit b de *Chirostoma* con la de otros atherinópsidos, 420 pb fueron sometidos a un alineamiento óptimo en el programa Blast-2 sequences (Tatusova y Medden, 1999). Los resultados muestran que para la optimización del alineamiento se incluyeron tres inserciones en la especie *C. lucius* en la posición 7-10 con relación a la especie *C. humboldtianum*, además de una adición en la especie *Craterocephalus marjoriae* en la posición 303 (Figura 38). El porcentaje promedio de identidad nucleotídica observada para 312 pb de las especies de *Chirostoma* respecto a los atherinópsidos *Atherinomus ogilbyi*, *Atherinosa microstoma* y *Craterocephalus*, fue del 78.7%. El análisis de las secuencias de dicho fragmento indican que la proporción de A+T y G+C es cercana al 1:1 (53.7% vs. 46.3%, respectivamente). La traducción canónica de esta región utilizando el código genético mitocondrial de vertebrados (Anderson *et al.*, 1981), se muestra en las Figuras 37 y 38. El número de sitios variables en el gen de *C. estor* y en relación con los de los

C. carpio ATGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCTCTCATTAAAATCGCTAACGACGCACTAGTTGAC 60
M A S L R K T H P L I K I A N D A L V D 20
C.e.estor CTTCGGAAAACCCACCCCCTATTA AAAAATTGCCAACGACGGAATCGTCGAC 51
L R K T H P L L K I A N D G I V D 17
C. carpio CTACCAACACCATCCAACATCTCAGCATGATGAACTTTGGATCCCTCCTAGGACTATGC 120
L P T P S N I S A W W N F G S L L G L C 40
C.e.estor CTCCCAGCTCCTGCCAACATTT CAGTTTGATGAACTTTGGCTCACTTCTAGGCCTTTGC 111
L P A P A N I S V W W N F G S L L G L C 37
C. carpio TTAATTACCCAAATTTTAACCGGCCTATT CCTAGCCATACTACCTCAGACATTTCA 180
L I T Q I L T G L F L A M H Y T S D I S 60
C.e.estor TTGATGGCCCAAATCCTCACcgggcTATTCTTAgcCATGCACTATACCTCCGACATCGCT 171
L M A Q I L T G L F L A M H Y T S D I A 57
C. carpio ACCGCATTCTCATCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTAAATTACGGCTGACTAATCCGT 240
T A F S S V T H I C R D V N Y G W L I R 80
C.e.estor ACAGCTTTCTCATCTGTGCGCCACATTTGCCGGGACGTAAACTACGGATGACTCATCCGA 231
T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R 77
C. carpio AATGTACACGCCAACGGAGCATCATTCTTCTTCATTTGCATCTACATACACATCGCCCGA 300
N V H A N G A S F F F I C I Y M H I A R 100
C.e.estor AACATGCATGCAAACGGAGccTCTtTCTTctTCaTctGCATCTACCTTCATATTGGACGA 291
N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R 97
C. carpio GGCCTATACTACGGATCATACTTTACAAAGAAACCTGAAACATTGGTGTAGTCCTTCTA 360
G L Y Y G S Y L Y K E T W N I G V V L L 120
C.e.estor ggCCTCTACTACGGATCATACTCTACAAAGAGACATGAAACGTgGGGgtGTCaTTCTT 351
G L Y Y G S Y L Y K E T W N V G V S L L 117
C. carpio CTACTAGTCATGATAACAGCCTTCGTTGGCTATGTTCTTCCATGAGGACAAATATCCTTT 420
L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F 140
C.e.estor CTTCTTGTAATAATGACAGCCTTTGTtGgCtatgtcCTTCTTGAgGACAAATATCATTC 411
L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F 137
C. carpio TGAGGCGCCACAGTAATCACAAACCTCCTATCTGCCGTACCATACATGGGAGACATGTTA 480
W G A T V I T N L L S A V P Y M G D M L 160
C.e.estor TGAGGGGcA 420
W G A 140
C. carpio GTCCAATGAATCTGAGGTGGGTTCTCAGTAGACAATGCAACACTAACACGATTCTTCGCA 540
V Q W I W G G F S V D N A T L T R F F A 180
C.e.estor
C. carpio TTCCACTTCTACTACCATTTGTTATTGCCGCCGCAACCATCATCCACCTGCTGTTCTC 600
F H F L L P F V I A A A T I I H L L F L 200
C.e.estor

C. carpio CACGAAACAGGATCAAACAACCCGATCGGACTAAACTCAGACGCAGACAAAGTCTCTTTC 660
 H E T G S N N P I G L N S D A D K V S F 220
 C.e.estor

C. carpio CACCCGTACTTCTCATACAAAGACCTCCTTGGGTTTCGTAATTATACTCCTAGCTCTTACA 720
 H P Y F S Y K D L L G F V I M L L A L T 240
 C.e.estor

C. carpio CTACTAGCACTATTCTCCCCTAACTTACTAGGAGACCCAGAAAACCTCACCCCCGCAAAC 780
 L L A L F S P N L L G D P E N F T P A N 260
 C.e.estor

C. carpio CCTCTAGTTACACCACCCACATCAAACCAGAATGATACTTCTTATTTGCCTACGCCATC 840
 P L V T P P H I K P E W Y F L F A Y A I 280
 C.e.estor

C. carpio CTACGATCAATTCCAAACAAACTCGGAGGTGTCCTTGCACTCCTATTCTCCATTCTGGTA 900
 L R S I P N K L G G V L A L L F S I L V 300
 C.e.estor

C. carpio TTAATAGTAGTACCACTACTACACACCTCAAACAACGAGGACTAACATTCCGCCCCATC 960
 L M V V P L L H T S K Q R G L T F R P I 320
 C.e.estor

C. carpio ACCCAATTCCTATTCTGAACCCTAGTAGCGGACATAATTATCCTAACATGAATTGGTGGC 1020
 T Q F L F W T L V A D M I I L T W I G G 340
 C.e.estor

C. carpio ATACCAGTAGAGCATCCCTTCATCATTATTGGACAAATTGCATCCGTCCTATACTTCGCA 1080
 M P V E H P F I I I G Q I A S V L Y F A 360
 C.e.estor

C. carpio CTATTCCTCATTTTTATGCCACTAGCAGGATGGTTAGAAAATAAAGCACTAAAATGAGCT 1140
 L F L I F M P L A G W L E N K A L K W A 380
 C.e.estor

C. carpio T 1141
 C.e.estor

Figura 37. Secuencia de 420 pb y 140 amino ácidos del gen citocromo B de *C. estor*
 con relación a la secuencia del mismo gen del pez *Cyprinus carpio*.

otros aterinópsidos fue de 72 (23.1%). Siete de estas fueron en la primera posición, seis en la segunda y 59 en la tercera posición (ver Figura 38), los cuales se traducen en cuatro cambios de amino ácidos codificados en la secuencia disponible de los tres aterinópsidos analizados. También se detectó una delección en la posición 303 de *Craterocephalus marjoriae* con relación a los otros aterinópsidos. Aunque es prematuro hacer conclusiones con relación a la utilidad de dicho gen en el presente estudio, si se puede definir como un buen marcador para inferir las relaciones filogenéticas de aterinópsidos. Se pudo observar que el número de transiciones (T↔C y A↔G) y transversiones (A↔T, A↔C, T↔G y C↔G) en 312 pb de las especies de *Chirostoma* con relación a los otros aterinópsidos fue del 22-23% (69-72 sitios), con un mayor número de transversiones 13.8% (43) sobre las transiciones 10.2% (32) (Tabla 33).

Tabla 33. Transiciones y transversiones en los nucleótidos del fragmento del gen cit B de las especies de *Chirostoma* con relación a los tres aterinópsidos.

Aterinópsidos/	Transiciones		Transversiones			
	TC	AG	AT	AC	TG	CG
<i>C. humboldtianum</i> y <i>C. lucius</i>	21	11	8	16	5	8
<i>C. estor</i>	22	11	8	17	6	8

El número de sitios variables entre las tres especies del grupo Jordani es de 7 (3 transiciones y 4 transversiones), además de tres delecciones en la posición 7-10 de *C. lucius* con relación a *C. humboldtianum* que podrían ser importantes taxonómicamente.

C.e.estor	CTTCGGAAAACCCACCCCCTATTTAAAAATTGCCAACGACGGAATCGTCGAC	51
	L R K T H P L L K I A N D G I V D	17
hum193	ATGGCCAATCTTCGGAAAACCCACCCCCTATTTAAAAATTGCCAACGACGCGATCGTCGAC	60
	M A N L R K T H P L L K I A N D A I V D	20
luc193	ATGGCT---CTTCGGAAAACCCACCCCCTATTTAAAAATTGCCAACGACGCAATCGTCGAC	57
	M A L R K T H P L L K I A N D A I V D	19
Crat		GCTTGG 6
		A W 2
Athmic		CCTTGG 6
		P W 2
Athogil		CTTGGC 6
		L G 2
C.e.estor	CTCCCAGCTCCTGCCAACATTTcAGTTTGATGAAACTTTGGCTCACTTCTAGGCCTTTGC	111
	L P A P A N I S V W W N F G S L L G L C	37
hum193	CTCCCAGCTCCTGCCAACATTTcAGTTTGATGAAACTTTGGCTCACTTCTAGGCCTTTGC	120
	L P A P A N I S V W W N F G S L L G L C	40
luc193	CTCCCAGCTCCTGCCAACATTTcAGTTTGATGAAACTTTGGCTCACTTCTAGGCCTTTGC	117
	L P A P A N I S V W W N F G S L L G L C	39
Crat	TCTCGGCGCCAAATCtTAACAGGACTCTTTCTTGCAATACACTATACTTCAGATATCGCT	66
	S R R Q I L T G L F L A M H Y T S D I A	22
Athmic	TCTCGGTGCCAAATCCTTGACAGGCCTATTcCTTGCCATACACTATACTTCAGATATCGCT	66
	S R C Q I L T G L F L A M H Y T S D I A	22
Athogil	TCTCGGCGCCAAATCCTAACAGGTCTCTTcCTTGCCATGCACTACACATCTGATATTGCA	66
	S R R Q I L T G L F L A M H Y T S D I A	22
C.e.estor	TTGATGGCCCAAATCCTCACCggccTATTCTTAgcCATGCACTATACTTCGACATCGCT	171
	L M A Q I L T G L F L A M H Y T S D I A	57
hum193	TTGATGGCCCAAATCCTTACCGGCCTATTCTTAGCCATGCACTATACTTCGACATCGCT	180
	L M A Q I L T G L F L A M H Y T S D I A	60
luc193	TTGATGGCCCAAATCCTtACCGGCCTATTCTTAGCCATGCACTATACTTCGACATCGcT	177
	L M A Q I L T G L F L A M H Y T S D I A	59
Crat	ACTGCCTTCTCCTCGGTGGCACACATCTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGATTAATCCGA	126
	T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R	42
Athmic	ACCGCCTTCTCTTCTGTTGCACATATTTGTGCGAGACGTAAATTACGGCTGACTAATCCGT	126
	T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R	42
Athogil	ACCGCATTCTCCTCAGTCGCACACATCTGCCGAGATGTAAACTACGGCTGACTAATCCGA	126
	T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R	42
C.e.estor	ACAGCTTTCTCATCTGTGCGCCACATTTGCCGGGACGTAAACTACGGATGACTCATCCGA	231
	T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R	77
hum193	ACAGCTTTCTCATCTGTGCGCCACATTTGCCGGGACGTAAACTACGGATGACTCATCCGA	240
	T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R	80
luc193	ACAGCTTTCTCATCTGTGCGCCACATTTGCCGGGACGTAAACTACGGATGACTCATCCGA	237
	T A F S S V A H I C R D V N Y G W L I R	79

Crat	AATATACATGCCAACGGCGCATCCTTCTTCTTCATCTGCATCTACCTCCACATTGGGCGA	186
	N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R	62
Athmic	AATATGCATGCAAACGGCGCTTCCTTCTTCTTCATCTGCATCTACCTCCACATTGGTCGT	186
	N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R	62
Athogil	AACATGCACGCCAACGGCGCATCTTTCTTTTTTCATCTGCATCTACCTTCACATTGGACGA	186
	N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R	62
C.e.estor	AACATGCATGCAAACGGAGccTCTtTCTTctTCaTctGCATCTACCTTCATATTGGACGA	291
	N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R	97
hum193	AACATGCATGCAAACGGAGCCTCTTTCTTCTTCATCTGCATCTACCTTCATATTGGACGA	300
	N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R	100
luc193	AACATGCATGCAAACGGAGCCTCTTTCTTCTTCATCTGCATCTACCTTCATATTGGACGA	297
	N M H A N G A S F F F I C I Y L H I G R	99
Crat	GGGCTCTATTATGGGTCTTACCTCTATAAAGAACTTGAAACGTGGGAGTTGTTCTCCTT	246
	G L Y Y G S Y L Y K E T W N V G V V L L	82
Athmic	GGCCTTTACTACGGCTCTTACCTCTACAAAGAAACATGAAATGTTGGGGTTCGTTCTCCTC	246
	G L Y Y G S Y L Y K E T W N V G V V L L	82
Athogil	GGCCTTTATTACGGCTCCTACCTCTATAAAGAGACCTGAACCGTTGGAGTAGTTCTTCTT	246
	G L Y Y G S Y L Y K E T W T V G V V L L	82
C.e.estor	ggCCTCTACTACGGATCATACTCTACAAAGAGACATGAAACGTgGGGgtGTCaTTCTT	351
	G L Y Y G S Y L Y K E T W N V G V S L L	117
hum193	GGCCTCTACTACGGATCATACTCTACAAAGAGACATGAAACGTGGGGGTTGTCCTTCTT	360
	G L Y Y G S Y L Y K E T W N V G V V L L	120
luc193	GGCCTCTACTACGGATCATACTCTACAAAGAGACATGAAACGTGGGGGTTGTCCTTCTT	357
	G L Y Y G S Y L Y K E T W N V G V V L L	119
Crat	CTCCTAGTTATGATGACTGCCTTCGTTGGCTATGTACTGCCTTGAAGCCAAATGTGCG-TC	305
	L L V M M T A F V G Y V L P W S Q M S	101
Athmic	CTCCTAGTCATGATGACAGCCTTCGTTGGCTACGTCCTTCCTTGAGGACAAATGTCATTC	306
	L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F	102
Athogil	CTCCTTGTAATGATGACTGCCTTTGTGCGCTACGTCCTTCCTTGAGGTCAAATGTCCTTC	306
	L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F	102
C.e.estor	CTTCTTGTAATAATGACAGCCTTTGTtGgCtatgtcCTTCCTTGAgGACAAATATCATTC	411
	L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F	137
hum193	CTTCTTGTAATAATGACAGCCTTTGTTGGCTATGTCCTTCCTTGAGGACAAATATCATTC	420
	L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F	140
luc193	CTTCTTGTAATAATGACAGCCTTTGTTGGCTATGTCCTTCCTTGAGGACAAATATCATTC	417
	L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F	139
Crat	TGAGGCC	312
	W G	103
Athmic	TGAGGGG	313
	W G	104
Athogil	TGAGGGG	313
	W G	104
C.e.estor	TGAGGGG	418
	W G	139
hum193	TGAGGGg	427
	W G	142
luc193	TGAGGGG	424
	W G	141

Figura 38. Alineación de un fragmento de 424-427 pb del gen citocromo B de tres especies de *Chirostoma* con relación a otros tres atherinópsidos (*Craterocephalus marjoriae*, *Atherinosoma microstoma* y *Atherinomorus ogilbyi*).

Fragmento del gen 16S ADNr

Por su parte el fragmento del gen 16S-600 de las especies reportadas en este estudio (promedio, 583 pb) corresponde a la parte final del mismo gen (posición 927-940 a 1513) en el pez teleósteo *Cyprinus carpio* y representa el 34.7% del gen de acuerdo a lo reportado para dicho pez (Figura 39). Para obtener el alineamiento óptimo de este gen el programa Blast-2 sequences (Tatusova y Medden, 1999) insertó 25 espacios (gaps) en las seis especies de *Chirostoma* analizadas (ver Figura 39).

Las secuencias obtenidas para las seis especies de *Chirostoma* se compararon con las del pez teleósteo *Cyprinus carpio*, debido a que las secuencias disponibles para otros atherinomorfos en la base de datos Genbank son muy pequeñas o presentan hasta el 10-12% de secuencias no específicas. El porcentaje promedio de identidad observado para 570 pb entre las especies de *Chirostoma* fue del 96%. El análisis de las secuencias de dicho fragmento indican que la proporción de A+T y G+C también es cercana al 1:1 (48.6% vs. 51.4%, respectivamente). El número de sitios variables en los 573 nucleótidos analizados del gen 16S ADNr en las seis especies de *Chirostoma*, con relación al de *C. carpio*, fue de 164 (además de 13 inserciones) con una tasa promedio de sustitución observada del 28.6% (Figura 40).

Carpa	GCCAAACAGCTAGCTTAACTACTTAATAACTAAACAATATAAATAAAAACAAAATAAGCCT	60
Carpa	GACACCAAAAACCTAAACCATTTTTTTTACCTGAGTATGGGAGACAGAAAAGGTTCCACAAA	120
Carpa	GCGATAGAAATAGTACCGCAAGGGAAAGCTGAAAGAGAAATGAAATAACCCATATAAGCA	180
Carpa	CTAAAAAGCAAAGATTAAACCTCGTACCTTTTGCATCATGATTTAGCCAGTACACCCAAG	240
Carpa	CAAAGAGACCTTTAGTTTGAAACCCCGAAACCAGGTGAGCTACCCCGAGACAGCCTATTA	300
Carpa	TGGCCCACCCCGTCTCTGTGGCAAAGAGTGGGAAGAGCTCCGGGTAGAAGTGACAGACC	360
Carpa	TACCGAACCTGGTGATAGCTGGTTGCCTAAGAAATGAATAGAAGTTCAGCCTCGTGCACC	420
Carpa	TCAAATCACACAAACAAAACAAGACTAAGAGAAACACATGAGAGTTAGTTAAAGGGGGTA	480
Carpa	CAGCCCCTTTAACAAGGACACAACCTTCCAGGAGGATAAAGATCATAATACATAAAAC	540
Carpa	ATACTGTTCTAGTGGGCCTAAAAGCAGCCATCTAAACAGAAAGCGTTAAAGCTCAGACAG	600
Carpa	AAAAAAGTTTATTATCCCGATAAAAAATCTTACTCCCCTAAATACTATTAGGCCAACCCA	660
Carpa	TGCCCCCATGGAAGAGATTATGCTAAAATGAGTAACAAGAAGGCCCGCCCTTCTTCCAAG	720
Carpa	AACAAGTGTAAGCCAAACCGGACCAACCATTGGCAACTAACGAACTCAATCAAAGAGAGC	780
Carpa	AATGTGAATTACAAAAAAACCCAAGAAAAATCCACAACCTAAGCTATCGTTACCCCCACAC	840
Carpa humbold lucius	TGGAGTGCCTTAAAGGAAAGACTAAAAGAAAAGGAAGGAACTCGGCAAACACAAGCCTCG	900 CG 2 CC 2
Carpa humbold lucius estor sphyraena promelas consocium	CCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGCAACGAACCAAGTATAGGAGGTCCAGCCTGCCC CCTGTTTATCAAAAAACATCGCCTCTTG-ACCCACCCATAATAAGAGGTCCCGCCTGCCC GCTGTTTAT-AAAAAACATCGCTTCTTG-ACCAAACCATAATAAGAGGTCCCGC-TGCC ATAAGAGGTCCCGCCTGCCC AAACCGTGAATAGATAAAAAGTCCCGCCTGCCC TTTTTAATAAACAGAGGTCCCGCCTGCCC ACCGTGTGATATGTAAAGGGTCCCGC-TGCC-	960 61 59 20 33 29 30
Carpa humbold lucius estor sphyraena promelas consocium	AGTGACTIONAAGTTCAACGGCCCGCGGTTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC TGTGACTTAAGGTTTAAACGGCCGCGG---TATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC TGTGACTTAAAGTTTACCGCCGCGG---TATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC TGTGACTTAAAGGTTTAAACGGCCGCGG---TATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC TGTGACTTAAAGGTTTAAACGGCCGCGG---TTTT--GACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC TGTGACTTAAAGGTTTAAACGGCCGCGG---TATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC TGTGACTTAAAGGTTTAAACGGCCGCGG---TTTTT-GACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCAC	1020 118 116 77 88 86 86

Carpa	TTGTCTTTTAAATAGAGACCTGTATGAATGGCTAAACGAGGGCTTAACTGTCTCCCCTTT	1080
humbold	TTGTCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTCCCT	178
lucius	TTGTCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTCCCT	176
estor	TTGTCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTCCCT	137
sphyraena	TTGTCTTTTAAATGGAGACCTGT-TGAATGGCACGAC-AGGGCTTAACTGT-TC-TT-CT	143
promelas	TTGTCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTAACTGTCTC-TTCCCT	145
consocium	TTGTCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTAACTGTCTC-TT-CT	144
Carpa	CAAGTCAGTAAAATTGATCTACCCGTGCAGAAGCGGGTATAACTACAAGACGAGAAGA	1140
humbold	CCAGTCAATGAAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATACCCTCATAAGACGAGAAGA	238
lucius	CCAGTCAATGAAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATACCCTCATAAGAC-AGAAGA	235
estor	CCAGTCAATGAAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATACCCTCATAAGACGAGAAGA	197
sphyraena	CCA-TCAATGAAAATTGATCTCCCCGTGCA-AAGCGGGGATACCCTCATAAGACGAGAAGA	201
promelas	CCAGTCAATGAAAATTGATCTCCCCGTGCA-AAGCGGGGATACCCTCATAAGACGAGAAGA	204
consocium	CCAGTCAATGAAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATACCCTCATAAGACGAGAAGA	204
Carpa	CCCTTTGGAGCTTAAGGTACAAAACCTCAACCACGTTAAGCAACTCAATAAAAAGCAAAA	1200
humbold	CCCTGTGGAGCTTTAGACTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCCACTAACGGCCCCGAA	298
lucius	CCCTGTGGAGCTTTAGACTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCCACTAACGGCCCCGAA	295
estor	CCCTGTGGAGCTTTAGACTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCCACTAACGGCCCCGAA	257
sphyraena	CCCTG-GGAGCTTTA-ACCTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCCACTAACGGCCCCGAA	259
promelas	CCCTGTGGAGCTTTAACTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCCACTAACGGCCCCGAA	264
consocium	CCCTGTGGAGCTTTAGACTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCCACTAACGGCCCCGAA	264
Carpa	CCTTGTGGATCATGAGATTTTACCTTCGGTTGGGGCGACCACGGAGGAAAGAAAAGCCTC	1260
humbold	CTAATTGGTCCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAATGAAAAACCC	358
lucius	CTAATTGGCCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAATGAAAAACCC	355
estor	CTAATTGGCCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAATGAAAAACCC	317
sphyraena	CTAATTGGTCCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGG- AAATGAAAAACCC	318
promelas	CTAATTGGTCCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAATGAAAAACCC	324
consocium	CTAATTGGTCCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAATGAAAAACCC	324
Carpa	CAGGTGGACTGGGAAAACCTCCTAAAACCAAGAGAGACATCTCTAAGCACAGAACATCTG	1320
humbold	CATGTGGAATGGGAGCACCCCTGCTCCTACAGCCGAGAGCCACAGCTCTAGGTAACAGAA	418
lucius	CATGTGGAATGGGAGCACCCCTGCTCCTACAGCCAAGAGCCACAGCTCTAGGTAACAGAA	415
estor	CATGTGGAATGGGAGCACCCCTGCTCCTACAGCCAAGAGCCACAGCTCTAGGTAACAGAA	377
sphyraena	CATGTGGAATGGGAGCACCC-TGCTCCTACAGCCAAGAGCCACAGCTCTAAGTAACA-AA	376
promelas	CATGTGGAATGGGAGCACCCCTGCTCCTACAGCCAAGAGCCACAGCTCTAAGTAACAGAA	384
consocium	CATGTGGAATGGGAGCACCCCTGCTCCTACAGCCAAGAGCCACAGCTCTAGGTAACAGAA	384
Carpa	ACCAAATATGATCCGGCTAACACATAGCCGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAAC	1380
humbold	TTTCTGACCAGTCAGATCCGG-CATAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAAC	477
lucius	TTTCTGACCAGTCAGATCCGG-CATAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAAC	474
estor	TTTCTGACCAGTCAGATCCGG-CATAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAAC	436
sphyraena	TTTCTGACCATCAAGATCCG--CATAGC-GATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAAC	433
promelas	TTTCTGACCAGTCAGATCCGG-CATAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAAC	443
consocium	TTTCTGACCAGTCAGATCCGG-CATAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAAC	443

Carpa	AGCGCAATCCTCTCCCAGAGTCCATATCGACGAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	1440
humbold	AGCGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	537
lucius	AGCGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	534
estor	AGCGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCG-CAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	495
sphyraena	AGCGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCGACAAGAGGGTTTACCACCTCGATGTTGGATC	493
promelas	AGCGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	503
consocium	AGCGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	503
Carpa	AGGACATCCTAATGGTGCAGCCGC-TATTAA-GGGTTCGTTTGTTC AACGATT-AAAGTC	1497
humbold	AG-ACATCCTAATGGTGCAGCCCGCTATTAAAGGGTTCGTT-GTTC AACGATTA AAAGTC	595
lucius	AGGACATCCTAATGGTGCAGCCGC-TATTAA-GGGTTCGTTTGTTC AACGAT--AAAGTC	590
estor	AGGACATCCTAATGGTGCAGCCGC-TATTAA-GGGTTCGTTTGTTC AACGAAT--AAGTC	551
sphyraena	AG-ACATCCTAATGGTGCAGCCGC-TATTAA-GGG--CGTTTGTTC AACGAAT-AAAGTC	547
promelas	AGGACATCCTAATGGTGCAGCCGC-TATTAA-GGGTTCGTTTGTTC AACGATT-AAAGTC	560
consocium	AGGACATCCTAATGGTGCAGCCGC-TATTAA-GGGTTCGTTTGTTC AACGATT-AAAGTC	560
Carpa	CTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGCAATCCAGGTCAGTTTCTATCTGTAACGCTACTT	1557
humbold	CTACGTGATCTGAGTT	611
lucius	CTACGTGATCTGAGTT	606
estor	CT-CCTGATCTGAGTT	566
sphyraena	CTACCTGATCTGAGTT	563
promelas	CTACGTGATCTGAGTT	576
consocium	CTACGTGATCTGAGTT	576
Carpa	TTCCTAGTACGAAAGGATCGGAAAAGAGGGGCCCATACTTAAAGCACGCCCCACCCCTAA	1617
Carpa	TTTATGAAAACAAATAAATAAAATAAAGGGAGAGCCAAAATCCCAGCTGGCCAAAATAAG	1677
Carpa	GACA	1681

Figura 39. Secuencia del fragmento del gen mitocondrial 16S ADNr de seis especies de *Chirostoma* con relación a la secuencia del mismo gen del pez *Cyprinus carpio*.

En la comparación entre las seis especies de *Chirostoma* el número de sitios variables, en un fragmento de 570 nucleótidos fue de 19 (además de 23 inserciones) (Figura 40). Se pudo observar que el número de transiciones y transversiones de cinco de las especies con relación a *C. humboldtianum* fue del 3.3%, con igual número de transiciones y transversiones (10, 1.66%).

Para generar árboles filogenéticos preliminares se utilizó las secuencias de nucleótidos de los atherinópsidos *Atherinomus ogilbyi*, *Atherinosoma microstoma* y *Craterocephalus marjoriae* como grupos externos para el gen cit B y en caso del gen 16S ADNr se utilizó a la especie *Cyprinus carpio*. Las filogenias generados con los métodos de distancia genética, dos parámetros de Kimura, ML y de Jukes-Cantor, mostraron consistencias en las topologías. Por ejemplo, para el fragmento del gen cit B los árboles generados con los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud (ML) mostraron que las especies *C. humboldtianum* y *C. estor* se encuentran más cercanamente relacionadas, que cualquiera de estas con *C. lucius*. Los arboles generados con Parsimonia para ambos genes (cit B y 16S ADNr) también sugieren que las especies del género *Chirostoma*, que corresponden al grupo Jordani tienen un origen más reciente que el de los otros atherinópsidos.

Si esto se confirma, dichos resultados estarían apoyando lo demostrado con los datos alozimáticos para las especies *C. grandocule* en esta misma tesis, que sugieren que las especies del género *Chirostoma* se encuentran en un proceso de evolución rápida que le ha permitido diversificarse en un periodo de tiempo evolutivo

humbold	CGCCTGTTTATCAAAAAACATCGCCTCTTGACCCACCCATAATAAGAGGTCCCGCCTGCC	60
lucius	.CG.....-.....T.....A.A.....-.....	
estor	
sphyraena	AA...GTGAATAG...A.A.....	
promelas	TTTTTA...AC.....	
consocium	AC.GTGTGATATG...AG.....-.....	
humbold	CTGTGACTTAAGGTTTAAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTT	120
luciusA.....C..C.....	
estorC.....	
sphyraena--.....	
promelas	
consocium	-.....-T.....	
humbold	GTCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTCCTCC	180
lucius	
estor	
sphyraena-.....-.....-.....	
promelas-.....	
consocium-.....	
humbold	AGTCAATGAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATACCCTCATAAGACGAGAAGACC	240
lucius-.....	
estor	
sphyraena	.-.....-.....	
promelas-.....	
consocium	
humbold	CTGTGGAGCTTTAGACTTACAGTAGGACCATGTCAAGGACCCCACT-AACGGCCCAAC	299
lucius-.....	
estor-.....	
sphyraena	...-.....-.....	
promelas-.....T.....	
consocium-.....	
humbold	TAATTGGTCCCCTCCTACATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAATGAAAAACCCCT	359
luciusC.....	
estorC.....T.....	
sphyraena-.....	
promelas	
consocium	
humbold	ATGTGGAATGGGAGCACCCCTGCTCCTACAGCCGAGAGCCACAGCTCTAGGTAACAGAAT	419
luciusA.....	
estorA.....	
sphyraenaA.....A.....	
promelasA.....A.....	
consociumA.....	

humbold	TTCTGACCAGTCAGATCCGGCATAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCCAGGGATAACAG	479
lucius	
estor	
sphyraenaTCA.....-.....-.....	
promelas	
consocium	
humbold	CGCAATCCTCTTCTAGAGCCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAG	539
lucius	
estor-.....	
sphyraenaC.....	
promelas	
consocium	
humbold	-ACATCCTAATGGTGCAGCCCGCTATTAAAGGGTTCGTT-GTTCAACGATTAAAAGTCCT	597
lucius	G.....-.....-.....T.....--.....	
estor	G.....-.....-.....T.....A.--.....	
sphyraena	-.....-.....-.....T.....A.-.....	
promelas	G.....-.....-.....T.....-.....	
consocium	G.....-.....-.....T.....-.....	
humbold	ACGTGATCTGAGTT	611
lucius	
estor	..C.....	
sphyraena	..C.....	
promelas	
consocium	

Figura 40. Comparación del 570 pb del gen mitocondrial 16S ADNr de las especies del género *Chirostoma*: humbold = *C. humboldtianum*, lucius = *C. lucius*, estor = *C. estor*, sphyraena = *C. sphyraena*, promelas = *C. promelas*, consocium = *C. consocium*. El símbolo indica que las letras son iguales, diferente letra significa substituciones y el símbolo -- significa una inserción o deleción de un nucleótido.

relativamente corto (Echelle y Echelle, 1984; Barriga-Sosa *et al.*, en prep). Sin embargo, no se puede concluir nada definitivo hasta que se obtengan resultados de otros análisis filogenéticos con los datos de las secuencias de amino ácidos y con mayor número de secuencias.

Por otro lado, los arboles preliminares generados con la distancia de Kimura del gen cit B sugieren la especie *C. lucius* es ancestral a las especies *C. humboldtianum* y *C. estor*, lo cual de corroborarse sería contradictorio a la hipótesis que sugiere que una forma similar a *C. humboldtianum* se diversificó y dio origen a lo que se conoce como el "grupo *humboldtianum*" (Barbour, 1973 a y b; Echelle y Echelle, 1984).

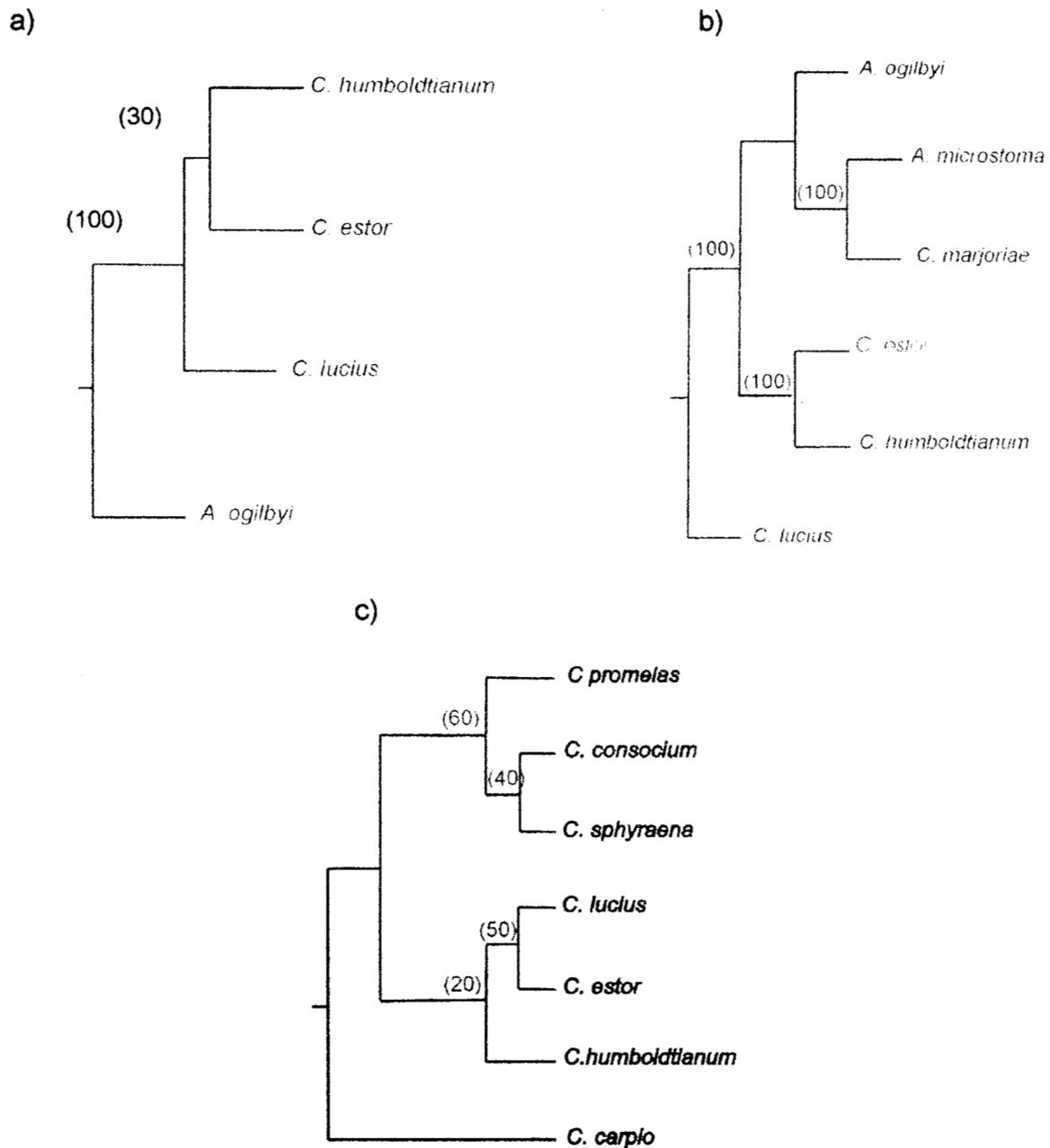


Figura 43. Arboles filogenéticos generados con la distancia de Kimura-2 parámetros: a) Parsimonia y b) máxima verosimilitud (ML) generados con 427 pb del gen cit B; c) Parsimonia de 570 pb del gen 16S ADNr. Los valores en paréntesis significan el número de veces que la agrupación ocurrió en todos los arboles y el número de pasos necesarios para formar ese clado, en ML y Parsimonia, respectivamente.

CONCLUSION GENERAL

Las especie del género *Chirostoma* endémicas de la Mesa Central de México son consideradas por varios autores como una “agrupación de especies” (species flock), debido a que presentan características particulares de dichas agrupaciones, como lo son altos niveles de simpatria y evolución morfológica y por encontrarse en un área geográfica pequeña. En nuestro país, son un grupo de gran importancia debido a que representan una considerable riqueza ictiofaunística única, además de ser de un gran impacto económico y cultural en regiones étnicas particulares de la Mesa Central. En la actualidad, las especies del género presentan grandes alteraciones en sus poblaciones naturales, entre las cuales se encuentran:

- a) debido a su importancia comercial, varias de las especies (principalmente las de peces blancos) de los lagos de Pátzcuaro y Chapala se han dispersado fuera de su hábitat natural induciendo con esto a la hibridación entre con-específicos,
- b) los mismos lagos sufren deterioros ambientales drásticos que influyen directamente en las especies, y
- c) la presión pesquera indiscriminada a la que están sometidas varias poblaciones y/o especies no permite la incorporación de algunas cohortes a la población, lo cual repercute en el tamaño efectivo de las poblaciones.

Los resultados generados de la presente tesis permiten explicar algunas de las causas probables de las alteraciones presentadas en las características de esta “agrupación de especies”. Por otra parte tanto los resultados morfométricos, como

los alozimáticos y los preliminares sobre las relaciones filogenéticas de los miembros del género apoyan algunas de las hipótesis planteadas para el grupo, como lo son:

a) que las especies del grupo están sujetas a cambios evolutivos rápidos, como se demuestra con los datos morfométricos y alozimáticos en la especie *C. grandocule*;

b) que el "grupo *humboldtianum*" tiene un origen reciente de diversificación, como lo demuestran los datos merísticos y las secuencias preliminares de genes mitocondriales.

- **Variabilidad morfométrica y merística.**

1) De esta parte de la tesis se puede concluir que 6 caracteres morfométricos (expresados como porcentaje de la longitud patrón longitud base aleta anal, distancia predorsal, longitud hocico, longitud mandíbula, longitud cefálica y altura mínima pedúnculo caudal) además de cuatro caracteres merísticos (escamas de la serie longitudinal, branquiespinas, escamas predorsales, número de rayos aleta anal) fueron informativos para la identificación de las 13 especies y tres subespecies del género *Chirostoma*.

2) Los análisis de CP y DA indicaron que los caracteres morfométricos longitud de la cabeza, distancia del hocico a la 1ª aleta dorsal y longitud de la base de la aleta pélvica además de los merísticos, número de rayos de las aletas anal y pectoral son suficientes para diferenciar a siete de las 16 especies analizadas (especies del "grupo *humboldtianum*"), y que dichos caracteres están asociados a la diversidad en los hábitos alimenticios y a los requerimientos natatorios de los organismos en la columna de agua.

- 3) El DA de 10 caracteres morfométricos permitió la discriminación entre muestras/poblaciones de la especie *C. grandocule* del Lago de Pátzcuaro, con un porcentaje de re-clasificación de 86-88%.
- 4) Por otro lado, los análisis de CP y DA de los ocho caracteres merísticos permitieron por un lado diferenciar a las cuatro especies del grupo Arge, con un porcentaje de re-clasificación del 89.9%.
- 5) Con relación a los caracteres merísticos, las variables branquiespinas, escamas predorsales e interdorsales contribuyeron a la discriminación de las especies *C. jordani* y *C. grandocule* del resto del grupo Jordani, con un porcentaje de re-clasificación de 71%. Los caracteres rayos de la 2da aleta dorsal, escamas predorsales, interdorsales y rayos de la aleta anal, por su parte, permitieron la re-clasificación de dos poblaciones de la especie *C. humboldtianum* (77-92%)
- 6) Para las especies del grupo Arge, los caracteres número de branquiespinas, escamas de la línea lateral e interdorsales, número de rayos de la 1ª aleta dorsal, de la aleta anal fueron suficientes para discriminar a las cuatro especies analizadas (98.6%).

● **Variabilidad alozimática**

- 1) Para las 13 especies y tres subespecies del género *Chirostoma* y utilizando acetatos de nitrocelulosa como soporte se resolvieron ocho loci polimórficos, de ellos, cuatro sirvieron para diferenciar a cuatro de las especies.

- 2) Los loci 1 y 2 de G6pdh fueron polimórficos sólo para la especie *C. promelas*, mientras que la especie *C. grandocule* presentó polimorfismo en el locus 2. El locus 1 de Ldh se resolvió como polimórfico solamente para una muestra de *C. grandocule*, mientras que el locus 2 de la misma enzima fue polimórfico para las especies *C. grandocule*, *C. estor* y *C. lucius*.
- 3) El valor promedio de H_E para las 13 especies y tres subespecies fue de 0.063, valor ligeramente mayor a lo reportado por Nevo (1978) para peces (0.051) y por Echelle y Echelle (1984) para 15 especies del género (0.044). Estas diferencias pueden atribuirse a la heterocigosidad en el número de enzimas y tipo de sistema utilizados y a factores biológicos como la hibridación.
- 4) Se detecta variación genética (H_E) y diferencias significativas en las frecuencias alélicas (<0.05) a nivel inter e intra-específico, excepto por las especies del Lago de Chapala.
- 5) Se observó desviación en el equilibrio de H-W en la mayoría de las muestras y loci polimórficos, sugiriéndose que en las muestras EPtz, HZac, Prom, Att y RSt dicha desviación se debe a un déficit de heterócigos en uno, dos o tres loci, por lo que no se descarta que exista una alta endogamia en estas muestras. Para las muestras Sph, Azi, EcC los resultados significativos se deben a un exceso de heterócigos, sugiriéndose así un posible cruzamiento externo (hibridación). Por otro lado, también se reporta la desviación en las muestras de *C. grandocule* (Barriga-Sosa, et al., en prep.) circunstancia también atribuible a procesos de endogamia.

- 6) El promedio del indicador de diferenciación genética entre especies (θ_p) y entre muestras/poblaciones (θ_s) sugiere una clara diferenciación genética entre especies y muestras/poblaciones (0.5672, s. D. 0.1316 y 0.6057, s. D. 0.1165, respectivamente).

Preliminares de los genes mitocondriales citocromo b y 16s ADNr

- 1) Las secuencias preliminares del gen mitocondrial citocromo B (36.8%) sugiere que este gen es un buen marcador para inferir las relaciones filogenéticas de peces aterinópsidos, incluyendo al género *Chirostoma* ya que se pudo observar que el número de transiciones y transversiones de las especies del género con relación a otros aterinópsidos fue del 23.1% (72 sitios).
- 2) De igual manera, la secuencia del fragmento del gen 16S ADNr (34.7%) también indica que este es un marcador adecuado para inferir las relaciones filogenéticas de peces aterinópsidos. Además indicó que la tasa promedio de sustitución (28.6%) es ligeramente mayor a la del cit B.

RECOMENDACIONES

Es importante mencionar que debido a la situación en la que se encuentra la gran mayoría de las especies del género, futuros trabajos sobre el género deberían de considerar la integración del esfuerzo y trabajo de los diversos grupos de investigación, para que los resultados que se obtengan de los mismos sean de utilidad nacional, tanto a nivel docencia, como de investigación y perspectivas del manejo de estas especies.

Entre los aspectos que son indispensables para mejorar nuestra comprensión de la situación actual y evolución del grupo, debemos:

- 1) Integrar de manera detallada los mapas de distribución actual de las diversas especies tanto de *Chirostoma* como *Poblana*.
- 2) Realizar estudios detallados de genética de poblaciones de las especies de mayor importancia tanto comercial como evolutiva (ej. *C. humboldtianum*, *C. estor*, *C. riojai* y *C. jordani*), así como de los posibles ancestros de los miembros del género (ej. *Menidia* y *Atherinella*).
- 3) Utilizar para dichos estudios poblacionales marcadores de ADN (microsatelites o RAPD's, o en su caso alozimas).
- 4) Determinar la secuencia nucleotídica completa de los genes mitocondriales estudiados en esta tesis, así como de genes nucleares altamente variables, que permitan detectar cambios en este grupo de organismos.

- 5) Utilizar la información generada en éste tipo de estudios para la discusión de la toma de decisiones sobre el manejo del recurso y plantear propuestas para la conservación de algunas de las especies.

REFERENCIAS

- Alaye, R. N. (1993a). El pescado blanco (Género: *Chirostoma*) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, composición de especies. Ciencia Pesquera 9: 113-128.
- Alaye, R. N. (1993b). Hematología de Aterínidos de aguas dulces: Género *Chirostoma* spp. del Lago de Pátzcuaro, Mich. Ciencia Pesquera 10: 97-109.
- Alaye, R. N. (1996a). Estudios de polimorfismo de la hemoglobina para identificar especies del género *Chirostoma* del Lago de Patzcuaro, Michoacán, México. Ciencia Pesquera 13: 1-9
- Alaye, R. N. (1996b). Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del lago de Patzcuaro, Michoacán, México. Ciencia Pesquera 13: 10-17.
- Allendorf, F. W. & R. F. Leary, (1997). Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species, the cutthroat trout. Conservation Biology 2 (2): 170-184.
- Altschul, S. F., T.L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Álvarez del Villar, J. (1950). Ictiología Dulceacuícola Mexicana II. Bibliografía Taxonómica. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 2(1-4): 201-216.
- Álvarez, J. Y M. T. Cortés. (1962). Ictiología Michoacana I. Claves y Catálogos de las especies conocidas. An. Esc. Nac. Cienc. Biol. México 2 (1-4): 85-142.
- Álvarez, J. (1963). El pez blanco de Zacapú, nueva especie para la ciencia. Ciencia 22 (6): 197-200.

- Álvarez, J. (1972). Algunos ejemplos de especiación en peces mexicanos. Acta Politécnica Mexicana 13(60): 81-89
- Álvarez, J. (1970). Peces mexicanos. Secretaria de Industria y Comercio. México. p. 120-128.
- Álvarez, J. (1972). Ictiología Michoacana V. Origen y distribución de la ictiofauna dulceacuícola de Michoacán. Anales Escuela Nacional Ciencias Biológicas 19: 155-161.
- Álvarez, J. (1974). Contribución al conocimiento de los peces fósiles de Chapala y Zacoalco (Aterínidos y Ciprínidos). Anales del Instituto Nacional de Antropología e Historia (4): 191-209.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrel, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Peron, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden & I. G. Young. (1981). Sequence and organization of human mitochondrial genome. Nature 290: 457-464.
- Andrade, T. E. (1990). Desarrollo embrionario y larval de *Chirostoma patzcuaro* Meek 1902 y de los híbridos obtenidos por fecundación artificial con *Chirostoma grandocule* Steindachner 1894 (Pisces: Atherinidae) del Lago de Patzcuaro, Michoacán, México. Tesis Licenciatura. Escuela de Biología, UMSNH, Michoacán. México.
- Antaramian, S. A. (1995) Aislamiento y caracterización parcial del DNA Mitocondrial del alga incolora *Polytomella spp.* Estudio de los genes que codifican para la subunidad I del citocromo oxidasa y para el citocromo b. Tesis Licenciatura. UNAM. 69 p.

- Arnould, C., P. Carot & M. F. Fauvet-Berthelot (1994). Introducción. 8000 años de la Cuenca de Zacapú. Evolución de los Paisajes y primeros Desmontes, p. 9-28. In: Cuadernos de Estudios Michoacanos 6. Ministere des Affaires Etrangeres, París-México.
- Arriaga, V. M. H., M. Guzmán A. y M. G. Morelos, L. (1995). Hábitos alimenticios. In: La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional. Pp 119-131. Ed. Universidad de Guadalajara. Comisión Editorial, México.
- Ashbaugh, N. A., A. A. Echelle & A. F. Echelle (1994). Genetic diversity in Red River pupfish *Cyprinodon rubrofluviatilis* (Atheriniformes: Ciprinodontidae) and its implications for the conservation genetics of the species. Journal of Fish Biology 45: 291-302.
- Awise, J. C. (1993). Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall (Eds). New York. 511 pp.
- Ayala, F. J. y J. A. Kieger Jr., (1984). Genética Moderna. Edit. Fondo Educativo Interamericano. Barcelona, España. 836 pp.
- Barbour, C. D. (1973a). The systematics and evolution of the genus *Chirostoma*, Swaison. Tulane Studies in Zoology and Botany 19 (3): 97-141.
- Barbour, C. D. (1973b). A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). A species flock from the Mexican plateau. Copeia 3: 533-566.
- Barbour, C. D. & B. Chernoff (1984). Comparative morphology and morphometrics of the pescados blancos (genus *Chirostoma*) from lake Chapala, México, p. 111-127. In: A. A. Echelle, I. Kornfield eds. Evolution of Fish Species Flocks. Univ. Maine Press Toronto.

- Barriga-Sosa, I. D. L. A. (en prensa a). Variabilidad genética de los Charales de los lagos de Pátzcuaro y Chapala: Análisis Preliminar. In: Memorias IV Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura. México. 5 pag.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A, L. E. Eguiarte and J. L. Arredondo-Figueroa. Population Subdivision of the endemic *Chirostoma grandocule* (Pisces: Atherinopsidae) From Lake Pátzcuaro, Michoacán, México: Morphometric and Allozyme Analyses. (en prep. a)
- Barriga-Sosa, I. D. L. A. y J. L. Arredondo-Figueroa (2001 a). Morphological and allozyme variation in *Chirostoma grandocule* Steindachner (Pisces: Atherinopsidae) from Lake Pátzcuaro, México. In: Memorias del Congreso Anual de la Society for Integrative and Comparative Biology. Chicago, Ill. Enero.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A, A. L. Aguirre-Ibañez & J. L. Arredondo-Figueroa. (2001 b). Morphological and genetic variation in seven species of the endangered *Chirostoma "humboldtianum" species group* (Atheriniformes: Atherinopsidae). International Journal of Tropical Biology and Conservation. 49-4 (en prensa).
- Barriga-Sosa, I. D. L. A. y J. L. Arredondo-Figueroa (1999). Variabilidad genética del charal *Chirostoma grandocule* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. In: Memorias del VI Congreso Conjunto de la Sociedad Mexicana de Genética y Sociedad Mexicana de Toxicología Genética. Guadalajara, Jal. Septiembre.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., I. Mora-Souza, E. Torres-Frías y J. L. Arredondo (1998). Análisis Preliminar morfométrico y genético de especies del género *Chirostoma*. In: Memorias Taller La Planta Experimental de Producción Acuícola a cinco años de su creación. UAM-I. Pag. 77-84. México

- Barriga-Sosa, I. D. L. A., I. Mora-Souza, E. Torres-Frías, C. Silva-Romero y J. L. Arredondo (1998). 16 especies del género *Chirostoma*: estudio comparativo de sus relaciones inter-específicas basado en datos isoenzimáticos, morfométricos y merísticos. In: Memorias del V Congreso Conjunto de la Sociedad Mexicana de Genética y Sociedad Mexicana de Toxicología Genética. Acapulco, Gro. Octubre.
- Barriga-Sosa, I.D.L.A., K. Beckenbach, B. Hartwick & M.J. Smith, 1995. The Molecular Phylogeny of five Eastern North Pacific *Octopus* species . Molecular Phylogenetics and Evolution 4 (2): 163-174.
- Berlanga, R. C. A., A. R. Luna, M. R. Nepita, y J. M. Vera (1997). Estabilidad y diversidad de la composición de peces del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Revista de Biología Tropical 45(4): 1553-1558.
- Bisquerra, R. 1989. Introducción conceptual al Análisis Multivariable. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, LISREL y SPAD. Vol. I y II. Barcelona. PPU. P.444.
- Boulenger, G. A. (1900). Description of two new Atherinoid fishes from México. Ann. Mag. Nat. Hist. 7 Ser. 5: 54-55.
- Bonnell, M. T. & R. K. Selander. (1974) Elephant seals: Genetic variation and near extinctions. Science 184: 2188-2201.
- Brown, A. J. L. & C. H. Langley (1979). Correlation between heterozygosity and subunit molecular weight. Nature 277: 649-651.
- Brooks, R. D. & A. D. McLennan (1984). *Phylogeny, Ecology and Behavior*. The University of Chicago. 434 p.

- Buth, D. G. & D. B. Crabtree (1982). Genetic variability and population structure of *Catostomus santaanae* in the Santa Clara drainage. Copeia: 439-444.
- Bychowski, H. K. & J. Cracraft (1993). Recovering Phylogenetic Signals from DNA Sequences: Relationships within the Corvine Assemblage (Class: Aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA Cytochrome b gene. Mol. Biol. Evol. 10(6): 1096-1214.
- Cabot, E. L. & A. T. Beckenback. (1992). Simulations editing of multiple nucleic acids and protein sequences with ESEE. Com. Appl. Biosci. 5: 233-234.
- Campton, D. E. (1987). Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations. In: Population Genetics and Fisheries Management (Ryman, N. & Utter, F., eds), pp. 161-192. Seattle WA. University of Washington Press.
- Castello, V. (1983). Utilización de técnicas multivariantes en el estudio de la morfológica de una población de barbos (*Barbus barbus sclateri* G.) (Pisces: Ciprinidae) en el Sur de España. Historia Natural 3(1): 1-15.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. Journal of Fish Biology 43: (Suppl. A): 53-73.
- Chacón-Torres, A. & C. Rosas-Monge 1995. A restoration plan for pez blanco in Lake Pátzcuaro, México. American Fisheries Society Symposium 15:122-126.
- Chacón-Torres, A. 1993. Pátzcuaro un Lago Amenazado. Bosquejo Limnológico, p. 144. 1ª. Ed. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Editorial Universitaria. Sría. De Difusión Cultural. México.

- Chacón-Torres, A., M. R. Pérez y I. E. Muzquiz. 1991. Síntesis Limnológica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Biología Acuática I, p. 1-48. Sría. De Difusión Cultural Editorial Universitaria. México.
- Cházari, E. (1884). Piscicultura en Agua Dulce. Ofic. Tipograf. Sec. Fomento. 828 pp.
- Chepko-Sade, B. D. & Z. T. Halpin (eds) (1987). Mammalian dispersal patterns. The effects of social structure on population genetics. Univ. Chicago Press, Chicago.
- Cooley, W. W., & P. R. Lohnes (1971). Multivariate Data Analysis. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 364 p.
- Cockerham, C. C: (1963). Variance of gene frequencies. Evolution 23: 72-84
- Cockerham, C. C: (1973). Analyses of gene frequencies. Genetics 74: 679-700
- Corti, M., R. S. Thorpe, L. Sola, V. Sbordoni & S. Cataudell (1988). Multivariate morphometrics in aquaculture: A case study of six stocks of the common carp (*Cyprinus carpio*) from Italy. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 45:1548-1554.
- Coyote, H. B. A. (2000). Análisis de las relaciones taxonómicas entre especies de *Poblana De Buen* (Pisces: Atherinopsidae) mediante marcadores RAPD. Tesis de Licenciatura. ENCB-IPN. 91pp.
- Crabtree, C. B. & D. G. Buth (1987). Biochemical Systematics of the Catostomid Genus *Catostomus*: Assessment of *C. clarki*, *C. plebeius* and *C. discobulus* including the Zuni sucker, *C. d. yarrowi*. Copeia 4:843-853.
- Crow, J. F. & M. Kimura (1970). An Introduction to Population Genetics Theory. New York. Harper & Row.

- Crow, J. F. & Aoki K. (1984). Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. Proceedings of the Natural Academy of Science USA. 81: 6073-6077.
- Crow, J. F. & M. Kimura (1970). An Introduction to Population Genetics Theory. New York, Harper & Row.
- Crozier, W. W. (1984). Electrophoretic identification and comparative examination of naturally occurring F₁ hybrids between brown trout (*Salmo trutta* L.) and Atlantic salmon (*S. salar* L.). Comparative Biochemistry & Physiology 78 B: 785-790.
- Cuadras, C. M. (1991). Métodos de Análisis Multivariante. Promociones y Publicaciones Universitarias, Barcelona. p. 664.
- De Buen, F. (1940). Pescado blanco, chacuami y charari del Lago de Pátzcuaro. Investigaciones de la Estación Limnológica de Pátzcuaro. 11 (3):1-24
- De Buen, F. (1940a). Sobre una colección de peces de los lagos de Pátzcuaro y Cuitzeo. Ciencia 1 (7): 306-308.
- De Buen, F. (1941). El Lago de Pátzcuaro. Recientes estudios limnológicos. Revista Geografía Instituto Panamericano Geografía Historia 1 (1): 20-44.
- De Buen, F. (1941a). Notas sobre la ictiología de las aguas dulces de México III. La lista de peces y la moderna clasificación. Investigaciones de la Estación Limnológica de Pátzcuaro (11) 1-9.
- De Buen, F. (1943). Los lagos michoacanos I. Caracteres generales. El lago de Zirahuén. Revista Sociedad Mexicana de Historia Natural 4(3-4): 211-232.
- De Buen, F. (1944). Los Lagos Michoacanos II. Pátzcuaro. Revista Sociedad Mexicana Historia Natural 5: 99-125.

- De Buen, F. (1945). Investigaciones sobre Ictiología Mexicana. Revista Sociedad Mexicana Historia Natural: 435-531.
- Dyer, B. S. & B. Chernoff 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei:Atherinomorpha). Zoological Journal of the Linnean Society 117: 1-69.
- Echelle, A. A. & A. F. Echelle (1984). Evolutionary Genetics of a "Species Flock:" Atherinid Fishes on the Mesa Central of Mexico, p 93-110. In: A. A. Echelle, I. Kornfield Eds. Evolution of Fish Species Flocks. Univ. Maine Press Toronto.
- Echelle, A. A., A. F. Echelle & D. R. Edds (1987). Population structure of four pupfish species (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*) from the Chihuahuan desert region of New Mexico and Texas: Allozyme variation. Copeia: 668-681.
- Echelle, A. A., A. F. Echelle & C. D. Crozier (1983). Evolution of an all-female fish, *Menidia clarkhubbsi* (Atherinidae). Evolution 37 (4): 772-784.
- Eguiarte, F. L. E. (1990). Genética de Poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm, en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Doctoral. UNAM. 190 p.
- Eknath, E. A., J. M. Macaranas, L. Q. Agustion, R. R. Velasco, M. A. Alban, M. R. Pante & R. S. V. Pullin. (1991). Biochemical and morphometric approaches to characterize farmed tilapias. The ICLARM Quaterly, 14(2): 7-9
- Lestón, C. R. & D. W. Jhonson (1990). Principios e Bioestadística. Ed. Manual Moderno. México. 298 p.
- Enriquez, B. M. A. y J. Paulo-Maya (1997). Osteología comparada de la suspensión mandibular de las especies *Chirostoma chapalae* Jordan y Snyder y *Chirostoma*

- García, O. R. (1990). Relaciones alimentarias entre cuatro especies de peces de la familia Atherinidae en el lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis Licenciatura. Escuela de Biología. UMSNH, Michoacán, México. 82 pp.
- García, M. E. (1976). Pescado blanco y charal nacidos en México. Pisces. Rev. De Piscicultura Técnica Pesquera. 1-4 pp.
- Gauldie, R.W. & P. J. Smith (1978). The adaptation of cellulose acetate electrophoresis to fish enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 61(B): 421-425.
- Gilles, A., G. Lecointre, E. Faure, R. Chappaz & G. Brun (1998). Mitochondrial phylogeny of the European ciprinids: Implications for their systematics, reticulate evolution and colonization time. Molecular Phylogenetics & Evolution 10(1) 132-143.
- Gillespie, J. H. (1991). The causes of molecular evolution. Oxford University Press, New York. p. 336.
- Greenwood, P. H. (1984). What is a Species Flock?, p 13-19. In: A. A. Echelle, I. Kornfield Eds. Evolution of Fish Species Flocks. Univ. Maine Press Toronto.
- Günther, A. (1861). Catalogue of the acanthopterygian Fishes in the British Museum. 3: 1-586.
- Guzmán, A. M. (1995). La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional, p 302. Ed. Universidad de Guadalajara. Comisión Editorial, México.
- Guzmán, A. M. y J. M. Ortiz, M. (1995). Distribución espacial. In: La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional. Pp 73-84. Ed. Universidad de Guadalajara. Comisión Editorial, México.

- Guzmán, A. M., S. Galaviz, L. y M. G. Morelos, L. (1995). Ciclos reproductivos. In: La pesca en el Lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional. Pp 93-109. Ed. Universidad de Guadalajara. Comisión Editorial, México.
- Gregg, R. E., J. H. Howard & F. Shonhiwa (1998). Introgressive hybridization of tilapias in Zimbabwe. Journal of Fish Biology 52: 1-10.
- Hair, J. F. Jr., R. E. Anderson, R. L. Tatham & W. Black (1992). Multivariate Data Analysis. With readings. McMillan Publishing Company. USA. 544p.
- Hartl, D. & A. G. Clark (1989). Principles of Population Genetics. 2nd. Edition. Sinauer Associates, Inc. Mass.
- Hebert, D. N. P. & M. J. Beaton (1989). Methodologies for Allozyme Analyses Using Cellulose Acetate Electrophoresis: A Practical Handbook. Helena Laboratories. Beaumont Tx.
- Hedrick, P. W. & M. E. Gilpin (1997). Genetic effective size of a Metapopulation, p.165-181. In: Metapopulation biology, ecology, genetics and evolution. Ed. I. Hanski & M. E. Gilpin. Academic Press. U.S.A.
- Hillis, D. M. & J. J. Bull (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. Systematic Biology 42: 182-192.
- Hillis, D. M. & C. Moritz (eds). (1990). Molecular Systematics. Sinauer Ass., Inc. Sunderland, Mass. 588 p.
- Hubbs, C. L. (1955). Hybridization between fish species in nature. Syst. Zool. 4:1-20.
- Hubbs, C. & G. E. Drewry (1959). Artificial Production of an intergeneric Atherinid fish hybrid. Copeia 1: 80-81.

- Humphries, J. M. (1984). Genetics of Speciation in pupfishes from Laguna Chichancanab, México, p. 129:139. In: A. A. Echelle, I. Kornfield Eds. Evolution of Fish Species Flocks. Univ. Maine Press Toronto.
- INEGI, (1988). Los municipios de Michoacán. Secretaria de Gobernación. México. p. 313-324.
- International Union of Biochemistry 1984. Nomenclature Committee. Enzyme Nomenclature. Academic Press. Orlando, Florida.
- Jansson, H. & T. Öst (1997). Hybridization between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*S. trutta*) in a restored section of the River Dalälven, Sweden. Canadian Journal of Fish & Aquatic Science. 54: 2033-2039.
- Jiménez, B. M. L y A. Gracia (1995). Evaluación de la pesquería multi-específica de charales (*Chirostoma* spp., Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Series de Zoología 66(2): 205 - 231.
- Jiménez, B. M. L. (1992). Estimación de los parámetros poblacionales de la pesquería multiespecífica del género *Chirostoma* como grupo funcional en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis Maestría en Ciencias del Mar. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Johnson, M. S. (1975). Biochemical Systematics of the Atherinid Genus *Menidia*. Copeia (4):662-691.
- Jordan, D. S. & B. W. Evermann. (1869). The fishes of North and Middle America, Bull. U.S. Natural Museum 47 (1-4): 1-3136.

- Jordan, D. S. (1880). Notes on a Collection of Fishes Obtained in the Streams of Guanajuato and Chapala Lake, Mexico by Prof. A. Duges. Proceedings of the United States National Museum (2): 298-301.
- Jordan, D. S. & B. W. Evermann (1896). The Fishes of North and Middle America: a descriptive catalogue of species of fish-like vertebrates found in the waters of North America, north of the Isthmus of Panama. Part I. Bulletin of the United States National Museum. 47:i-ix + 1-1240.
- Jordan, D. S. & J. O. Snyder (1899). Notes on a Collection of Fishes from the Rivers of México, with description of twenty new species. Bulletin of the United States Fish Commission 19 (4): 115-147.
- Jordan, D. S. 1900. The White Fish of the Lake Chapala. American Naturalist (34): 523p.
- Jordan, D. S. & C. L. Hubbs. 1919. Studies in Ichthyology. A monographic review of the family Atherinidae or silversides. Leland Stanford Junior University Publications. University Series 40: 1-87.
- Jukes, T. H. & C. R. Cantor (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro H. N. (ed) Mammalian protein metabolism, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary Rate at the Molecular Level. Nature 217: 624-626.
- Kimura, M. (1986). DNA and the Neutral Theory. Philosophical Transactions. Royal Society of London. Series B 312: 343-354

- Kiril'Chik, S. V. & S. Ya Slobodyanyuk (1997). Evolution of a fragment of mitochondrial DNA cytochrome b gene in some Baikalian and non-Baikalian Cottoidei species. Molekulyarnaya Biologiya (Moscow) 31(1): 168-175.
- Koehn, R. K. & W. F. Eanes. (1978). Molecular structure and protein variation within and among populations. Evolutionary Biology 11: 39-100.
- Lara, V. A. (1980). Introducción de nuevas especies al lago de Pátzcuaro y su posible perjuicio a las especies nativas. Memorias del Segundo Simposio Latinoamericano de Acuicultura. Tomo II. Departamento de Pesca. Sría. de Pesca. México 489-524 pp.
- Ledesma, A. P. C. (1990). Análisis de las fases ontogénicas primarias y reconocimiento del híbrido obtenido por fecundación artificial entre *Chirostoma attenuatum* y *Chirostoma patzcuaro* (Pisces: Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Mich., México. Tesis Licenciatura. Escuela de Biología. UMSNH, Michoacán. México, 91 pp.
- Levene, H. (1949). On a Matching problem arising in genetics. Annals of Mathematics and Statistics 20: 91-94
- Libosvárky, J. & J. Kux (1982). Multivariate analysis of morphometric characters in teh genus *Gobio*. Folia Zool. 31: 83-92.
- Lombarte, A. and J. Lleonart, (1993). Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. Environmental Biology of Fishes 37: 297-306
- Loveless, M. D. & J. L. Hamrick. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Annu. Rev. Ecol. Syst. 15: 65-95.

- Leonart, J. (1991). Co603c (Programa para Análisis de Correspondencia).
Barcelona, España.
- Lydeard, C., M. C. Wooten & A. Meyer (1995). Cytochrome b sequence variation and
a molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Gambusia*
(Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Canadian Journal of Zoology 73(2): 213-227.
- Manly, B. F. J. (1986). Multivariate Statistical Methods. A primer. Chapman y Hall,
U. S. A. 159.
- Martín del Campo, R. (1940). Los vertebrados de Pátzcuaro. An. Inst. Biol. México.
11 (2): 481-492.
- Martín del Campo, R. (1955). Productos biológicos del Valle de México. Rev. Mex.
Est. Antropol. 14: 53-57.
- Mayden, R. L., B. M. Burr, L. M Page & R. R. Miller (1992). The Native Freshwater
Fishes of Central América. In: Mayden R. L. (Ed.), Systematics, Historical
Ecology and North American Freshwater Fishes. Standford University Press.
Standford, California.
- Meek, E. (1902). A contribution to the Ichthyology of Mexico. Field Collection of the
Chicago Museum. Zoological Series 3(6): 63-118
- Meek, E. (1904). The Fresh Water fishes of México. North of the Isthmus of
Tehuantepec. Field Collection of the Chicago Museum. Zoological Series (7): 1-
252 p.
- Meyer, W. E., H. Tichy & J. Klein (1998). Phylogeny of African cichlid fishes as
revealed by molecular markers. Heredity 80(6): 702-714

- Miller, R. R. & M. L. Smith (1986). Origin and Geography of the Fishes of Central México. Pp 487-517. In: C. H. Howitt y E. O. Wiley (Eds), Zoogeography of North American Fishes. Wiley-Interscience. New York.
- Miller, M. P. (1998). Tools for Population Genetic Analysis. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University, Flagstaff. Arizona.
- Moncayo, E. R. (1996). Estructura y Función de la Comunidad de peces de la Laguna de Zacapú, Michoacán, México. Tesis Maestría, p. 172. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de ciencias Marinas. México.
- Mora-Souza, P. I. (1998). Estudio merístico, morfométrico y molecular de 8 especies del género *Chirostoma* Informe Final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 52.
- Morelos, G. M. y A. M. Guzmán (1995). Ictiofauna del lago. In: La pesca en el lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional. Universidad de Guadalajara. Comisión Nacional del Agua. P.49-71.
- Motoo, K. (1983). The neutral theory of molecular evolution. In: Evolution of genes and proteins, ed. M. Nei & R. K. Koehn, pp. 208-233. Sunderland, Mass. Sinauer.
- Murphy, W. J. & G. E. Collier (1997). A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): The role vicariance and the origins of annualism. Molecular Biology & Evolution 14(8): 790-799
- Murphy, R. W., J. W. Sites, D. G. Buth & C. H. Haufler. (1990). Proteins: Isozyme electrophoresis. Pag. 45-126. In: D. M. Hillis y C. Moritz Eds. Molecular Systematics. Sunderland, Ma.

- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes y V. W. Rodwell (1998). Bioquímica de Harper. 14ª. Ed. Edit. Manual Moderno, México.
- Nei, M. (1977). F-statistics and analyses of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics. London 41: 225-233.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics (89): 583-590.
- Nei, M. & S. D. Kumar. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. New York. 333p.
- Nei, M., P. A. Fuerst & R. Chakraborty. 1978. Subunit molecular weight and genetic variability of proteins in natural populations. Proceedings of the National Academy of Science. USA 75: 3359-3362.
- NOM-059-Ecol-1994. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. Mayo. 61 p.
- Nyman, O. L. (1970). Electrophoretic analysis of hybrids between salmon (*Salmo salar* L.) and trout (*Salmo trutta* L.). Trans. Am. Fish. Sco. 99:229-236.
- O'Connell, M., M. C. Dillon, J.M. Wright, P. Bentzen, S. Merkouris & J. Seeb (1998). Genetic structuring among Alaskan Pacific herring populations identified using microsatellite variation. Journal of Fish Biology (53): 150-163.
- Oseguera, F. (1990). Caracterización morfológica de estadios embrionarios y juveniles de *Chirostoma grandocule* Steindachner (1896) y verificación de híbridos con *Chirostoma attenuatum* Meek (1902) del Lago de Páztcuaro, Mich. Tesis Licenciatura. UMSNH. Michoacán, México. 86 p.

- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. MacMillan, L. Stice & G. Grabowski inédito (1991). The simple fool's guide to PCR. Version 2.0. University of Hawaii. 44p.
- Paulo-Maya, J. (2000). Situación actual sobre el conocimiento de la biología del género *Chirostoma* Swaison (Pisces: Atherinopsidae). Ejercicio Predoctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. 208 pp.
- Pérez, C. 1996. Econometría y análisis estadísticos multivariados con Statgraphics. Técnicas avanzadas. Ra-Ma, España. 745 pp.
- Pérez, V. H. (1987). Contribución al Conocimiento de la Hibridación Natural entre *Chirostoma estor* Jordan 1879 contra *Chirostoma grandocule* Steindachner 1894, en el Lago de Pátzcuaro, Mich., México. Tesis Licenciatura. UMSNH, Michoacán. México.
- Purdom, E. C. (1993). Genetics and Fish Breeding. Chapman & Hall. New York. Pp.84-109.
- Rauda, O. J. (1987). Contribución al conocimiento de la biología pesquera del charal pinto *Chirostoma patzcuaro*, Meek 1902 (Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Mich., México. 77 pp. Tesis de Licenciatura. UMSNH, Michoacán, México.
- Raymond, M. & F. Rousset (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.
- Regan, C. T. (1906-1908). Pisces. In : *Biología Centrali Mexicana* 8:1-203, pp. In: Taylor & Francis (Eds). Red Lion Court, Fret Street.
- Reynolds, J., B. S. Weir & C. C. Cockerham (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short term genetic distance. Genetics 105: 767-779.

- Rincón, C. M. C. (1992). Estudio de Polimorfismo de Hemoglobina para la Identificación de las Especies del Género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán México, p. 95. Tesis de Licenciatura. UMSNH, Michoacán, México.
- Rodríguez, R. A. y L. C. Granado (1987). Estudio morfológico del aparato mandibular en cinco especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Universidad de Sevilla, España. Revista Biología Tropical 35(1): 97-106.
- Rodríguez, R. A. y L. C. Granado (1988). Características del aparato bucal asociadas al régimen alimenticio en cinco especies coexistentes del género *Chirostoma* (Lago de Chapala, México). Revista Chilena de Historia Natural 61: 35-51.
- Rodríguez, R. A. y L. C. Granado (1988a). Características morfo-funcionales de *Chirostoma consocium*, *Ch. chapalae* y *Ch. oclotane* del Lago de Chapala, México (Pisces: Atherinidae). An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nat. Autón. México. 15(2): 265-272.
- Rodríguez, E. C. (1991). Verificación a nivel experimental de la existencia de híbridos entre las especies *Chirostoma estor* y *Chirostoma grandocule* (Pisces: Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Mich. México. Tesis Licenciatura. UMSNH. Michoacán, México. 101 p.
- Roe, K. J., D. Conkel & C. Lydeard (1997). Molecular systematics of Middle American cichlid fishes and the evolution of trophic-types in 'Cichlasoma (Amphilophus)' and 'C. (Thorichthys)'. Molecular Phylogenetics & Evolution 7(3): 366-376
- Rojas, C. P. M., B. M. L. Jiménez, M. P. Toledo y Mares, B. G. (1993a). Estimación de los parámetros de crecimiento y ciclo de madurez gonádica del charal blanco

- Chirostoma grandocule*, Steindahner, 1894 (Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Mich. Ciencia Pesquera (10): 69-77.
- Rojas, C. P. M., B. L. Jiménez, M. P. Toledo, y B. G. Mares (1993b). Estudio de algunos aspectos biológicos del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro como base para su administración y cultivo. Informe final de Investigación. Instituto Nacional de la Pesca. CRIP. Patzcuaro, Michoacán. México.
- Rosas-Monje, C. (1994). Cultivo experimental de crías de pez blanco *Chirostoma estor estor* Jordan 1873 (Pisces: Atherinidae), en jaulas de cultivo y bajo régimen alimenticio de cinco dietas. Tesis Licenciatura. UMSNH. Michoacán, México. 168pp.
- Rosas, M. (1967). Investigaciones relacionadas con el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*, Jordan 1879). Perciformes, Atherinidae. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 110 pp.
- Rosas, M. (1976). Datos biológicos de la ictiofauna del lago de Pátzcuaro, con especial énfasis en la alimentación de sus especies. Pp. 299-366. In: I.N.P. Mem. Simp. Pesquerías en Aguas Continentales. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tomo I. México
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York
- Sánchez, P. S. M. O. (1992). Biología reproductiva del charal blanco *Chirostoma grandocule* (Steidachnerm 1894, Pisces:Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Mich., México. Tesis Licenciatura. UMSNH. Michoacán, México, 62 pp.
- SEPESCA. (1994). Cultivo del pez blanco. Secretaria de Pesca. México, D. F. 23 pp.

- Sent, S: G. y R. Calendar (1986). *Genética Molecular*. 2da edición. Universidad de California Berkeley. Cuba. 967 p.
- Slatkin, M. (1985). Gene Flow and the geographic structure of natural populations. Science 263: 787-792.
- Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal (1973). Numerical Taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.
- Shultz, L. P. (1948). A revision of six subfamilies of atherine fishes, with descriptions of new genera and species. Proceedings of the United States National Museum 98 (3220): 1-48.
- Solórzano, P. A. (1961). Contribución al conocimiento de la biología del charal prieto del Lago de Pátzcuaro, Mich. (*Chirostoma bartoni* Jordan y Evermann, 1896). Tesis de Licenciatura. ENCB-IPN. México. 69 pp.
- Solórzano, P. A. (1963). Algunos aspectos biológicos del pescado blanco del lago de Pátzcuaro, Mich. (*Chirostoma estor*, Jordan 1879). Instituto Nacional de Investigaciones Pesqueras. Secretaría de Industria y Comercio. Dirección General de Pesca e Industria. México, 15 pp.
- Solórzano, P. A. y Y. López. (1965). Nueva especie de *Chirostoma* capturada en la Laguna de Victoria o de Santiago Tilapa, Estado de México (Pisces: Atherinidae). Ciencia. México 24(3-4) 145-150.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf (1995). Biometry. 3rd. Edition. W.H. Freeman N. Y.
- Soria-Barreto, M., J. Pulo-Maya, A. Chacón-Torres y V. Segura G. (1998). Peces Dulceacuícolas Mexicanos XVI. *Chirostoma estor* (Pisces: Atherinidae). Zoología Informa (38): 33-46.

- Soria-Barreto, M. (1999). Morfometría comparada del aparato mandibular en las especies de *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro. Tesis de Licenciatura. UMSNH. Michoacán, México.
- Steindachner, F. (1894). Vorläufige Mittheilung über einige neue Fischarten aus den Seen von Mexico. Anz. Akad. Wiss. Wien v. 31 (no. 15):147-149.
- Tatusova, T. A. & Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". FEMS Microbiol Lett. 174:247-250
- Toledo, P. (1987). Sobre la presencia del pescado blanco *Chirostoma lucius* (Pisces:Atherinidae) en el Lago de Pátzcuaro, p. 6. Centro Regional Investigaciones Pesqueras. Secretaría de Pesca. México.
- Torres-Frías, E. (1998). Análisis merístico, morfométrico y molecular de 7 especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Informe Final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp. 51.
- Teugeles, G. G., Vreven E. (1998). Preliminary results on morphometric differentiation between natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae). The ICLARM Quarterly, 14: 165-173.
- Valenciennes, A. in Cuvier A. & A. Valenciennes (1835). Histoire Naturelle des Poissons. 10: 1-482.
- Van der Bank, F. H., G. D. Engelbrecht, H. Sauer-Gürth, M. Wink & P. F. S. Mulder (1998). Allozyme and DNA sequence data support speciation of Northern and Southern populations of silver catfish, *Schilbe intermedius* (Rüppel, 1832). Comparative Biochemistry and Physiology (Part A) 120: 531-543.

- Verspoor, E. & J. Hammar (1991). Introgressive hybridization in fishes: the biochemical evidence. Journal of Fish Biology 39 (Suppl. A): 309-334.
- Volgelstein & Gillespie (1979). USBioclean. United States Biochemical. p 1-5.
- Vreven, E. J., B. Adepo-Gourene, J. F. Agnese y G. G. Teugels. 1998. Morphometric and allozyme variation in natural populations and cultures strains of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). Belg. J. Zool. 128: 23-32.
- Vrijenhoek, R. C. (1998). Conservation genetics of freshwater fish. Journal of Fish Biology 53: 394-412.
- Ward, R. D., M. Woodwark & D. O. F. Skibinski (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. Journal of Fish Biology 44: 213-232.
- Weir, B. S. (1990). Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Ma. 377 pp.
- Weir, B. S. & C. C. Cockerham (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- White, B. N. (1985). Evolutionary Relationships of the Atherinopsinae (Pisces:Atherinidae). Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County (368): 1- 20.
- Wilson, C. A. (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. Science 253: 1503-1507.
- Woolman, A. J. (1894). Report on a Collection of Fishes from the Rivers of Central and Northern Mexico. Bulletin United States Fishery Commission (14): 55-56.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. Genetics 28:114-138.

- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. Ann. Eugen. 15: 326-354.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19:395-420.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.
- Zardoya, R. & I. Doadrio (1998), Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: Systematic and biogeographical implications. Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences 265(1403): 1365-1372

ANEXO 1.

REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL

International Journal of Tropical Biology and Conservation

www.ucr.ac.cr

www.ots.ac.cr

www.ots.duke.edu

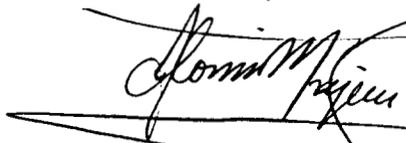
18 de junio del 2001
RBT-167-01

A QUIEN INTERESE

El manuscrito "**Morphological and genetic variation in seven species of the endangered fish *Chirostoma "humboldtianum" species group* (Atheriniformes: Atherinopsidae)**", por Irene de los Angeles Barriga-Sosa, Ana Laura Ibáñez-Aguirre y José Luis Arredondo-Figueroa, ha sido aceptado para publicación en la *Revista de Biología Tropical / International Journal of Tropical Biology and Conservation*. Se incluirá en el volumen **49-4**, diciembre del 2001 que se encuentra en imprenta.

Nuestra próxima comunicación corresponderá a las pruebas de imprenta, junto con las cuales se enviará un formulario por si son necesarias separatas adicionales. Las separatas se envían por correo aéreo normal en los días siguientes a la impresión de la revista. Los autores que desean recibirlas por correo certificado, deben enviar *ahora* \$2.00 para cubrir los gastos, junto con una nota explicativa.

Atentamente,


Julián Monge-Nájera
Editor



IMPORTANTE: Por favor envíenos inmediatamente dos números confiables de fax para recibir allí sus pruebas de imprenta (el segundo es por si falta el primero, lo cual ocurre con frecuencia). Estos números deben ser completos: incluya desde el código de su país hasta cualquier número de extensión. El incumplimiento de esta instrucción causaría que usted no pueda corregir las pruebas. Las pruebas se enviarán dentro de varios meses.

**50 ANIVERSARIO / 50TH ANNIVERSARY
1953-2002**

Telefax (506) 207 5550 rbt@rbt.ucr.ac.cr
Escuela de Biología 15, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

Morphological and genetic variation in seven species of the endangered *Chirostoma* “*humboldtianum* species group” (Atheriniformes: Atherinopsidae)

Irene de los Angeles Barriga-Sosa*, Ana Laura Ibáñez-Aguirre and José Luis Arredondo-Figueroa.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Depto. de Hidrobiología. Planta Experimental de Producción Acuícola. Av. Michoacán y la Purísima S/N. Col. Vicentina. Del. Iztapalapa. C. P 09340 México, D. F. Fax: (5) 804-4738.

*Corresponding author e-mail: pexpa@xanum.uam.mx

ABSTRACT: The *Chirostoma* “*humboldtianum* group” is comprised of seven silverside species considered as a monophyletic assemblage because of their high genetic and morphological similarities. The group includes five moderate large species, “peces blancos” (117 - 300 mm standard length - SL) and two smaller species, “charales” (70 - 142 mm SL). These species are of great economical, cultural and ichthyological interest for local populations and their management practices are controversial. We investigated the morphometric, meristic and allozyme variation of the seven species (13 populations) and relate such information to aspects of life history, differences in habitat and management procedures. Nineteen morphometric, eight meristic variables (by multivariate analysis) and 23 allozyme loci were compared among the seven species and populations of *Chirostoma*. Principal component analysis (PC) of morphometric and meristic data indicate that both sets of data provided information to differentiate among the seven species. The variables that accounted for most of this differentiation were head length (HL), predorsal 1 length (P1L) and length of pelvic fin base (PfbL). PC and Discriminate Analysis (DA) with morphometric data also suggested the differentiation of populations within *Chirostoma grandocule* (83% correctly classified organisms), whereas PC and DA with meristic data differentiate populations of *C. humboldtianum* (80% correctly classified organisms). The most important morphometric variables for the differentiation were anal fin height (Afh), length of anal fin base (AfbL) and predorsal 2-length (P2L) and the meristic variables D2fR, PdS and AfR. The genetic variability data indicate changes in values of some of the species in relation to previously reported data. *Chirostoma grandocule*'s present populations show a reduction in H_e (0.002 vs. 0.009). Whereas other species showed an increase, for instance, *C. consocium consocium*, *C. humboldtianum*, *C. lucius*, *C. promelas* and *C. sphyraena* (averaged $H_e = 0.069$ vs. 0.027.). θ_{POP} indicates significant genetic differentiation among the analysed species (0.247, $s.D.$ 0.159) and θ_{SUBPOP} supports the morphological data that suggest intra-specific differentiation (0.360, $s.D.$ 0.154, respectively)

Key words: morphometric, meristic, genetic variability, inter-specific, *Chirostoma*, México

The species of the genus *Chirostoma* Swanson are largely endemic to the Mesa Central de México. It has been suggested that they make up a “species flock” (Barbour 1973a and 1973b, Barbour and Chernoff 1984, Echelle and Echelle 1984), because they have characteristics such as extremely high levels of local sympatry and morphological evolution and because of their unusually high speciosity in a relatively small geographic area (Greenwood 1984, Echelle and Echelle 1984).

According to Barbour (1973a & b), the Jordani group is comprised of 11 primarily lacustrine species and two subspecies with moderate to large-sizes (70 - 142 mm to 117 - 300 mm). Osteological and genetic data supported the hypothesis that seven species from the Jordani group are a monophyletic assemblage, descendant from a *Chirostoma humboldtianum*-like ancestor (Barbour 1973b, Barbour and Chernoff 1984, Echelle and Echelle 1984, White 1985). Thus, the seven species included in the present study are considered as the “*humboldtianum* group”. The species of the present study are *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes; *Chirostoma grandocule*, Steindachner; *Chirostoma estor estor*, Jordan; *Chirostoma lucius*, Boulenger; *Chirostoma sphyraena* Boulenger (Barbour 1973a: 108, 112, 114, and 118, respectively); *Chirostoma consocium consocium*, (Jordan and Hubbs 1919); and *Chirostoma promelas* (Jordan and Snyder 1899).

Genetic changes in fresh-water fish populations or species can arise just in a few years (Carvalho 1993, Ward *et al.* 1994) when populations or species are exposed to contrasting environmental conditions (Barriga-Sosa *et al.*, in prep¹.), even when they exchange only a few migrants. Most members of the “*humboldtianum* group” are species that have been dispersed out of their natural range, because of their great economical and ichthyological relevance. Also some of the species (those species from Lake Pátzcuaro) are exposed to contrasting environmental conditions and to high fishing pressure. Thus, in this paper we investigated the levels of morphological and allozyme variation of the members of the “*humboldtianum* group” several years after they were first genetically monitored and under the consideration that most of the species have been distributed out of their natural endemic habitats. It is noteworthy that *C. promelas* and *C. compressum* (the latter considered a distinct form of *C.*

grandocule) are nowadays considered as endangered species (NOM-059-ECOL-1984), because of their actual low population densities in the first case and because of the “extinction” during a temporary drying off lake Cuitzeo in the later. The larger forms *C. e. estor*, *C. lucius* and *C. sphyraena* are also found in very low densities at the present times (Alaye 1993a, Jiménez y Gracia 1995, Villicaña-Vázquez, pers. comm.)

MATERIALS AND METHODS

Sampling: Samples were taken from commercial artisanal catches from 11 sites out of four lakes (Fig. 1). From five localities at Lake Chapala (1a, b, c, d & e), the largest and most polluted of the lakes. All of the localities at this lake are situated along the southern region. From Zacapú Lagoon, Michoacán (2), a remnant of a larger lake that has been recently proposed as an ecological reserve (Moncayo 1996). From Lake Pátzcuaro, Michoacán (3), characterised as highly eroded and perturbed. The collecting sites at this lake were Ojo de Agua (3a), San Jerónimo (3b) and Ichupio (3c). These sites belong to the northern basin of the lake, which is the deepest section and is free of aquatic vegetation (De Buen 1941, Chacón *et al.* 1991). Janitzio (3d), is a site that belongs to the northern portion of the southeastern basin, and is characterised by shallow waters and the abundance of aquatic vegetation, and finally from Lake Zirahuén (4), characterised as the youngest and deepest of the four lakes (Chacón-Torres 1993). Sample size for the genetic analysis included 176 fishes and 367 for the morphometric and meristic analysis.

PLEASE INSERT FIG. 1 HERE.....//

Morphometric (M) and meristic (m) analyses: We used 27 variables for species identification, twenty-three were reported by Barbour (1973a) and Barbour and Chernoff (1984), the remaining four variables were reported as informative for the separation of 16 species of *Chirostoma* (Barriga-Sosa in prep.²). Nineteen variables were morphometric (M). Total length (TL), standard length (SL), head length (HL), orbit diameter (OrB), snout length (SnL), mandible length (ML), postorbital head length

(PoHL), caudal peduncle length (CpL), anal fin length of base (AfbL), predorsal 1 length (P1L), predorsal 2 length (P2L), prepelvic length (PpL), pelvic fin length of base (PfbL), body depth (BD), caudal peduncle length least depth (LdCp), anal fin height (AfH), pectoral fin height (PfH), first dorsal length (D1H) and second dorsal height (D2H). All characters were measured to the nearest 0.1mm with dial callipers. Eight meristic variables (m) were also recorded: lateral line scales (LIS), predorsal scales (PdS), interdorsal scales (IdS), pectoral fin rays (Pfr), first dorsal fin spines (D1fS), second dorsal fin rays (D2fR), anal fin rays (AfR), and gill rakers (GR).

Each category of data (M) and (m) was analysed separately. To eliminate differences related to size, morphometric data was transformed (Corti *et al.* 1988, Cuadras 1991) according to two different criteria: i) logarithmic transformation of each character and ii) proportion, representing each character relative to length. We also analysed the original data (o) of each of the categories (Mo and mo). The data was submitted to multivariate analyses with two descriptive and exploratory methods that do not require of previous hypotheses: Principal Component (PC) and Reciprocal Averaging (RA). Discriminate Analyses (DA) was also utilised with both data sets to investigate discrimination among samples. Multivariate Analysis was carried out with the computer program STATGRAPHIC Plus version 2.1.

Allozyme data analyses: Homogenates of liver and muscle tissues were subjected to horizontal, cellulose acetate gel electrophoresis of allozymes for a standardised time of 20-35 minutes at 220-350 volts and at room temperature (RT°). All samples were screened for 12 enzymes; alcohol dehydrogenase (Adh, E.C. 1.1.1.1), glucose dehydrogenase (Gdh, E.C. 1.1.1.47), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3pdh, E.C. 1.2.1.12), glucose-6-phosphate isomerase (Gpi, E.C. 5.3.1.9), hydroxybutate dehydrogenase (Hbd), isocitrate dehydrogenase (Idh, E.C. 1.1.1.42), L-lactate dehydrogenase (Ldh, E.C. 1.1.1.27), malate dehydrogenase (Mdh, E.C. 1.1.1.37), malic enzyme (Me, E.C. 1.1.1.40), phosphogluconate dehydrogenase (6Pgdh, E.C. 1.1.1.44), phosphoglucomutase (Pgm, E.C. 5.4.2.2) and xantin dehydrogenase (Xdh, E.C. 1.1.1.204). Five electrophoretic buffers were used

(Tris-EDTA borate pH 8.5; Tris-citrate pH 6.5; Tris-citrate pH 8; Tris citrate-borate pH 8.2; and Tris-glycine pH 8.5). The staining procedures were those described by Hebert and Beaton (1989). The allele designations used in this study correspond with that of Barriga-Sosa (in prep².)

For each locus analysed, the allele frequencies, the proportion of polymorphic loci (P_{99} criteria), the mean number of alleles per locus and the expected (H_e) heterozygosity were calculated for each species and sample. Deviations from the expected Hardy-Weinberg proportions were tested using Fisher's exact test (GENEPOP 3.1 Raymond and Rousset 1995). Fisher's combined probability test (Sokal and Rohlf 1995) was used to test the significance of allele frequency differences between species and samples (TFPGA 1.3 Miller 1998). The probabilities that F indices (Weir and Cockerham 1984) associated with each locus and sample was significantly different from zero were also computed with GENEPOP. The estimator of Weir and Cockerham (1984), F -statistics was used to measure preliminary levels of genetic population structuring (TFPGA 1.3 Miller 1998). The following parameters were estimated: f , the correlation of genes within individuals within populations, θ and θ_s , correlation of genes of different individuals in the same population and subpopulation. Estimates of the variance of these parameters were obtained by jack-knifing across loci. F -statistics were tested for differences from zero permuting (2000 replicates) alleles within sample (f) and alleles between sample (F , θ and θ_s) over all loci. It is known that the species showed high genetic identities, thus we estimated the genetic relationships between pairs of species and samples (populations) by using Reynolds *et al.* (1983) co-ancestry estimate of genetic identity and distance (I_c & D_c). Cluster analysis was performed with the UPGMA method of the TFGA 1.3 program (Miller 1998) using bootstrap sampling of loci and a consistency index (Felsenstein 1985). The restricted maximum likelihood (ML) method (Felsenstein 1973) was performed with the PHYLIP package (Felsenstein 1995). Evaluation of individual branches within trees was performed by bootstrapping of loci (bootstrapping proportions >70% were considered as highly significant and >50% as considerably accurate, Hillis and Bull 1993).

RESULTS

The species examined, total sample size per species (N) utilised in each analysis (Ng= genetic, NM= morphometric, Nm=meristic) and collecting sites are summarised in Table 1. Differences in sample size between morphometric/meristic and allozyme analysis were due to the quality of the organisms collected, since some of them were not available *in situ* because of their very low actual densities and some samples were obtained from previously frozen (-10° to -20°C) catches. Therefore, sample size in each location for most of the species except *C. consocium consocium* (CCha), *C. humboldtianum* (HPtz & HZir) and *C. grandocule* (GI-97 & GJ-96) were smaller for the genetic analysis compared to the morphometric and meristic analysis.

PLEASE INSERT TABLE 1 HERE.....//

Morphometric (M) and meristic (m) data analyses: Table 2 summarised the cumulated percent of the variance resulted from PC and RA analyses, it includes the cumulated percent for the first three components (I, II & III) with the transformed (i & ii) and original (o) morphometric (M) and meristic (m) data.

PLEASE INSERT TABLE 2 HERE.....//

Inter- and Intra-specific variation: For the morphometric data, the first two components of the PC and RA analyses with data (ii) suggested an interesting arrangement within species. The correlation matrix of both analyses showed that these were different in sign and magnitude, a pattern that expresses variation in “shape” but not in “size” (data upon request), we utilised PC analysis because it explained the highest percentage of the variance (see Table 2). Figure 2 showed an arrangement where most of the *C. humboldtianum* organisms are grouped in the positive area, except for those from Lake Pátzcuaro (HPtz), which are shown in the negative section of the plot. The same tendency is observed for *C. grandocule*, where a group of organisms are in the origin of the coordinates (GJ-96) and another group is in the negative area of the plot (GI-97). The remaining species do not show any special arrangement, although *C. c. consocium* does not show much dispersion. Variables that accounted the

highest percentage of the variance and contributed to the separation of groups were PfbL (0.99), HL (0.98) and P1L (-0.97).

PLEASE INSERT FIG. 2 HERE//

Due of the results observed in *C. humboldtianum* and *C. grandocule* we proceeded to analyse each of these species and samples following the (ii) criteria with PC and DA. PC analysis indicated the separation of groups thus, we further analysed these species with DA. Discriminate functions I and II contributed 74 and 20% of the total variance (Fig.3), the variables that contributed with the highest variation to the separation of these groups were AfH (0.47) and AfbL (0.45) for the first discriminate function and P2L (0.63) for the second. Table 3, shows that the correct classification percentage for these organisms were 65% and 90% for HZir and HPTz respectively and that *C. grandocule* organisms were better classified, with 86 and 88% for GI-97 and GJ-96, respectively.

PLEASE INSERT FIG. 3 & TABLE 3 HERE.....//

For the meristic data we utilised PC because it explained the highest variance (see Table 2). As observed with PC analysis of M (ii) data, most of *C. humboldtianum* organisms are shown in the positive area of the plot (Fig. 4), excepted those from lake Pátzcuaro (HPTz), which are shown in the negative section of the plot. Two groups are also observed with *C. grandocule*, one in the origin of the co-ordinates (GJ-96) and a second group in the negative section of the plot (GI-97). In this analysis as well as in the PC with M (ii) data the latest species showed an overlap area with 17 organisms from GI-97 mixed with those from GJ-96. The remaining species do not show a particular arrangement except for *C. c. consocium*, which does not showed much dispersion. The variables that accounted with the highest variance were AfR (0.97), GR (-0.96) and PfR (0.95).

PLEASE INSERT FIG. 4 HERE.....//

Similarly to the M (ii) PC analysis, the m (o) data for *C. humboldtianum* and *C. grandocule* prompted further analysis with PC and DA. Similar results to those detected with PC of M (ii) data were observed, thus, we proceed with DA analysis. Discriminate functions I & II accounted with 84 and

14% of the variance, respectively (Fig. 5). The most important variables in this analysis were D2fR (0.87) and PdS (-0.45) for the first discriminate function and LIS (-0.68) and AfR (0.66) for the second. Table 4, shows that the correct classification percentage was 80 and 72% for *C. grandocule* samples (GI-97 and GJ-96, respectively) and that *C. humboldtianum* was better classified with 77 and 92% for HZir and HPtz, respectively.

PLEASE INSERT FIG. 5 & TABLE 4 HERE.....//

Allozyme inter-specific variation: From the enzyme systems assayed, 23 presumptive loci were detected. Only one locus was detected for Gdh, G3pdh, Hbd, and Pgm. Two loci were observed for Adh, Idh, Ldh, P6gdh and Xdh and three loci for Gpi, Mdh and Me. The allelic frequencies of the polymorphic loci are shown in Table 5. Locus 1 for Gdh, G3pdh, Hbd and loci 1 and 2 for Adh, Idh and Xdh were monomorphic in all samples. The average $P_{.99}$ for the group was 14. At the species level the highest average $P_{.99}$ value was found in *C. e. estor* ($P_{.99}= 22$), followed by *C. humboldtianum* (18), *C. promelas* (17), *C. c. consocium* and *C. sphyraena* (13), *C. lucius* (11) and *C. grandocule* (2). All polymorphic loci had significant differences in allelic frequencies among the species ($P<0.05$, data upon request), except G6pdh-1. The mean heterozygosity observed within the group was 0.060.

Intra-specific variation: At the intra-specific level, genetic variation differences ($P_{.99}$ and H_e) were observed among samples. For instance, in *C. e. estor* samples EPtz ($P_{.99}$ 26 and H_e 0.079) and ECha (17 and 0.088, respectively). In *C. humboldtianum* samples HCha (22 and 0.084) in relation to samples HPtz, HZir and HZac (17 and 0.087, 0.072 and 0.089, respectively); in *C. lucius* samples LCha (13 and 0.049) in relation to LPtz (9 and 0.035) and in *C. grandocule* samples GJ-96 (4 and 0.002), whereas GI-97 showed no polymorphic loci. The genetic variability values for PCha were $P_{.99}$ 17 and H_e 0.076; CCha and SCha had intermediate levels of polymorphism (13) and heterozygosity values of 0.060 and 0.071, respectively. Differences in genetic variability values within species can be due to the presence of more alleles in EPtz, HCha and LCha and less in ECha, HPtz, HZac, HZir and LPtz. In ECha, HPtz and HZac samples, the alleles had more intermediate allelic frequencies, while in EPtz some rare

alleles were in very few frequencies. PCha is the only species with intermediate allele frequencies in locus G6pdh-1 and with relatively low frequencies at locus G6pdh-2, the rest of the species/samples showed intermediate fixed frequencies at these loci. EPtz and LPtz samples showed intermediate allele frequencies for locus Ldh-2 (Table 5). All polymorphic loci had significant differences in allelic frequencies among samples (Ps, Table 5). Significant differences in allelic frequencies within populations of *C. e. estor*, *C. humboldtianum* and *C. lucius* were also observed in one or another polymorphic loci and population (see P_p, Table 5).

PLEASE INSERT TABLE 5 HERE.....//

We found a significant departure from in H-W equilibrium in most samples (Table 6). Although it is noteworthy that sample size in our study and for this estimate is a limiting factor. Especially in the larger species, we consider it because we believe it could be related to the management practices carried out for the species in within the last century (to be discussed latter on). The significant results in samples EPtz, HZac, LCha and PCha are due to a deficit of heterozygous at one, two or three loci in one or another sample, suggesting that inbreeding may occur in these samples at lakes Pátzcuaro, Chapala and Zacapú Lagoon. Whereas for samples HCha and SCha the significant results were due to an excess of heterozygous, due perhaps to outbreeding (hybridisation) occurring within these “species” in lake Chapala. The averages indicate that inbreeding was stronger in LCha and HZac and outbreeding in SCha.

PLEASE INSERT TABLE 6 HERE.....//

Genetic differentiation, distances and cluster analyses: Preliminary Weir and Cockerham estimates of *F*-statistics support our previous results, which suggest that events, inbreeding as well as outbreeding may occur in within this group of species. It also supports the genetic differentiation within the group. Average jack-knifed θ_{POP} and θ_{SUBPOP} indicate significant genetic differentiation among species and samples (0.247, s_D 0.159 and 0.360, s_D. 154, respectively) (Table 7a). Differentiation within samples (populations) of *C. e. estor*, *C. lucius* and *C. humboldtianum* are also observed (Table 7b). The average

jack-knifed θ_{SUBPOP} values within these populations ranged from 0.604, s_{D} 0.471 for *C. lucius*; 0.277, s_{D} 0.139 for *C. e. estor*, to 0.072, s_{D} 0.032 for *C. humboldtianum*. In the case of *C. lucius* and *C. e. estor* samples (LCha, LPtz & ECha, EPtz), processes such as genetic isolation and local inbreeding ($F=$ 0.490 – 0.148, Table 7b) might be important on the differentiation of such populations, although the θ_{SUBPOP} value of the second species is of lower magnitude. The *C. humboldtianum* populations in the other hand (HCha, HPtz, HZir & HZac) showed lower but significant θ_{SUBPOP} values (0.072, s_{D} 0.032).

PLEASE INSERT TABLES 7 A & B HERE.....//

To visualise differences in allelic frequencies between species we obtained the co-ancestry estimate of genetic identity and distance (I_c & D_c) for the seven species and 13 samples. Genetic identity values between samples/populations, ranged from 0.0006 for PCha/ECha to 2.7990 for LCha/GI-97 and distance values ranged from 0.0006 for PCha/ECha to 0.9303 for LPtz/GI-97. Negative values were also observed between closely related samples, for instance PCha/LCha (-0.0030) or PCha/SCha (-0.0630). The genetic identity and distance values for *C. grandocule* samples are low and prompted for further investigations (Barriga-Sosa *et al.*, in prep¹). For *C. humboldtianum* samples, the values although low are significantly different from zero for three of the samples for instance, HPtz/HCha (0.1212), HZir/HCha/Ptz (0.0633, Table 8).

PLEASE INSERT TABLE 8 HERE.....//

UPGMA dendrogram generated by using the co-ancestry genetic distances for the thirteen samples clearly illustrate such relationships. Thus, one main cluster contains two groups from which *C. grandocule* is equidistant with the highest distance because of the low genetic variability observed in the species. The first group includes the large species/samples from lake Chapala (ECha/SCha/PCha/LCha), whereas the second cluster includes the *C. humboldtianum* samples (HZir/HZac/HCha) from which HPtz separates as a distinct sample. Samples CCha, EPtz and LPtz are also found in this cluster. Bootstrapping proportions for the main branches of the UPGMA tree were above 50% (Fig. 6), but for the internal branches were lower than 50%, thus are not reliable. A

maximum likelihood tree grouped all samples into two distinct assemblages from which HZac is equidistant, with bootstrap probabilities of >50% (Fig. 7).

PLEASE INSERT FIGURES 6 & 7 HERE.....//

DISCUSSION

The members of the *Chirostoma* “*humboldtianum* species group” have been for centuries of great economical and ethnic importance, but despite these facts little is known about their basic biology. Further knowledge is critical for the conservation and for developing ecologically sound and stable management practices for these species. These species were for a long time restricted to Chapala, Pátzcuaro, Zirahuén or Zacapu lakes, except for *C. humboldtianum* with a wider range of distribution. However, inadequate fishing practices and the increased human settlements in the surrounding areas, have led to the dissemination of these species into other water basins and as a result we observed an increase in the genetic variation and differentiation in some of these species and a decrease in others. From Echelle and Echelle (1984) allele frequency data (Appendix 2, pages 108-109) we obtained the levels of genetic variation ($P_{.99}$ and H_e) for the seven species and compared those to the results obtained in the present study. The overall $P_{.95}$ and H_e estimates in our study are among those reported by Nevo (1978, in Hartl 1987) in a review of 51 species of fishes (15.2 and 0.051 respectively). However they are slightly higher to those from Echelle and Echelle’s (1984) data (12 and 0.022) (Table 9). Although these differences can be related to sample size in some of the species, other factors can also be considered. For instance, hybridisation between species, has been suggested since the early 80’s (Barbour and Chernoff 1984, Toledo 1987) and experimentally demonstrated (Pérez 1987, Andrade 1990, Estrada 1991, Alaye 1993 a & b); the introduction of unidentified eggs into other water basins (Toledo 1987, Alaye 1993 a & b) and to fishing pressure (Jiménez 1992, Rojas *et al.* 1993 a & b, Chacón y Rosas 1995, Jiménez y Gracia 1995).

Inter-specific morphological and genetic variation: The PC results with M (ii) and m (o) data show that five morphometric and two meristic variables contributed the most in discriminating among the

seven species. Two (M) variables are from the head (head length and postorbital head length), the remaining related to the swimming and stability of the animals in the water column (pelvic fin length of base, predorsal 1 length and anal fin length of base, anal fin rays and pectoral fin rays). The variability detected in these measurements is associated to the diverse feeding habits of these organisms and to their different swimming requirements in the water column, since several of these species co-exist in the same habitat. Indeed, differentiation in the mandible apparatus has been earlier reported for species from Lake Chapala (Rodríguez y Granado 1987, 1988). The limitation of a small sample size of *C. promelas*, *C. sphyraena*, *C. e. estor* and *C. lucius* in this study is directly related to the decrease in their abundance in recent years (Alaye 1993b, Jiménez y Gracia 1995, Villicaña-Vázquez, pers. comm.). It also restricted our conclusions on the morphological analysis of these species. However, Barbour and Chernoff (1984) suggested that eight morphometric variables related to the head and the swimming ability of these fishes were powerful discriminators of *C. promelas* (mean $n=24$), *C. sphyraena* (mean $n=40$) and *C. lucius* (mean $n=66$) from lake Chapala. Nevertheless, in spite of the limitation in sample size, our allozyme results suggest significant differences in the genetic variability of these four species ($H_e = 0.035 \pm 0.028 - 0.076 \pm 0.037$, Table 9) as well as an inter-specific differentiation ($\theta = 0.137$, $s.D. 0.052$). Although it should be considered that inter-specific differentiation were found in samples of *C. e. estor* and *C. lucius* from different lakes. Differentiation at the molecular level has been suggested for the latest species, for instance, the differentiation on the haemoglobin molecule of *C. lucius* in relation to that from other *Chirostoma* species from lake Pátzcuaro (Alaye 1996 a & b). The possible causes of H-W deviation (in addition to small sample size) resulting from a high significant deficit of heterozygous in LCha sample (+0.636), suggests that both inbreeding as well as a possible bottleneck might be the causes of such deviation. Indeed the actual LCha population is reduced to few organisms that do not reach large sizes (119-179 mm SL). This suggests that effective population size might be highly reduced. *C. promelas* and *C. sphyraena* are also rare in Lake Chapala (Villicaña-Vázquez, per. comm.) and are not found elsewhere in the country. The

presence of these species in the lake is limited to organisms recruited for a Rescue Program (Centro Acuícola “Tizapán el Alto”, Jalisco. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca-SEMARNAP).

Chirostoma c. consocium, the most abundant species from Lake Chapala (Rodríguez y Granado 1987, Morelos y Guzmán 1995) does not show significant morphological or meristic variation, and the levels of genetic variation are considered as intermediate compared to those observed within the group of species studied. Rodríguez y Granado (1987) analysed morphological characters of the mandibular apparatus with PC and DA analysis of species of *Chirostoma* from Lake Chapala and reported similar results to those we obtained here for *C. c. consocium*. Our allozyme analysis indicates that the species showed slightly lower levels of polymorphism but higher heterozygosity values compared to those reported by Echelle and Echelle (1984) ($P_{.99}$ 13 vs. 17, H_e 0.060 vs. 0.049, respectively, Table 9). Differences among these values are due to the intermediate frequencies of the heterozygous alleles. The genetic identity values observed between *C. c. consocium* and the large species from lake Chapala ranged from 0.0879 to 0.2035 (*C. humboldtianum* and *C. e. estor*, respectively) and supports the separation of this species in the cladogram. The relatively low levels of morphological and allozyme variation observed in this species can relate to the homogenisation on its distribution within the lake, which might indeed favour random mating ($F= 0.088$, Table 6).

Intra-specific morphological and genetic variation: The DA analysis with both (M) and (m) data indicate the separation of *C. humboldtianum* samples into two distinct groups (HZir & HPtz, with higher sample sizes) suggesting differentiation within the species. Better results are shown with the meristic data. The discrimination results are supported by the allozyme data (genetic differentiation, identity and cluster data). Although the genetic differentiation value is lower ($\theta_{\text{SUBPOP}} = 0.072$, s.d. 0.032) to those observed among other samples, it is significantly different from zero. This value is similar to the low end found in G_{st}/F_{st} estimates of other fresh-water fish species. For instance, for catostomids (0.035-0.507), cyprinodontids (0.015-0.189), atherinids (0.014-0.461) (Ward *et al.* 1994

and references therein) and for *C. grandocule* (0.025) (Barriga-Sosa *et al.* In prep.¹). The morphological, meristic and allozyme variation observed within these populations must relate to their geographic isolation. For instance, Lake Zirahuén, is characterised as relatively stable, young, homogenous water mass, supports only two species of the genus *Chirostoma*, and the fishing practices are oriented to sport fishing of larger species. Concordant to this characteristics, sample HZir showed the lowest heterozygosity value (HZir, 0.072 _{S.E.} 0.036) among those observed for the species and an *F* value (probability value associated with the *F* inbreeding coefficients, 0.264) which suggest inbreeding in this population. In contrast, samples HPTz and HCha had the higher heterozygosity values (0.085-0.087, _{S.E.} 0.038- 0.041, respectively) and the identity values for HPTz and the other samples (0.062, 0.063 to 0.121 for HZac/HZir/HCha, respectively), are concordant with an earlier hypothesis that suggested that the population found in Pátzcuaro is indeed distinct (Alaye 1993b). Lakes Pátzcuaro and Chapala in contrast with Lake Zirahuén and Zacapu Lagoon, are the largest lakes and are highly polluted, eroded and support highly heterogeneous assemblage of *Chirostoma* and other fish species (Berlanga *et al.* 1997). An increase of heterozygous organisms in these populations can be partially explained by the fact that they are exposed to higher selective pressure (competition for food and space and high fishing pressure). Moreover, it is noteworthy that *C. humboldtianum* has not been reported for lake Chapala, and that the negative values related to inbreeding ($F = -0.105$) indicate to us that hybridisation between this and other “charal” or “peces blancos” from this lake can not be ruled out.

The morphometric and meristic data also indicates that *C. grandocule* samples GI-97 and GJ-96 may be distinct subpopulations, as observed with the DA M (ii) data analysis (86 and 88% correctly classified organisms). The morphological variation observed within these “subpopulations” from Lake Pátzcuaro can be explained by a high phenotypic plasticity as a response to the contrasting environmental conditions that prevail within the lake. Barriga-Sosa *et al.* (In prep.¹) showed with a substantially larger sample size, a clear morphological and allozyme differentiation of these

“subpopulations” due apparently in part to the contrasting environmental conditions of the Northern and Southern regions of the lake.

In general it appears that most species of the “*humboldtianum* group” are encountering drastic pressures, especially the larger forms *C. promelas* and *C. sphyraena* which are restricted to Lake Chapala. It is critical to establish for this group of species a long term population ecology and genetics study, employing more polymorphic genetic markers, such as RAPD’s, AFLP’s and microsatellites in addition to allozymes.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is part of the PhD. dissertation of the first author at the División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa. Funds for this research were provided by Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO H017). We thank Claudio Osuna P., Sergio Sabanero M. (CRIP, Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de Pátzcuaro, Michoacán), Manuel Guzmán (Instituto de Limnología, Universidad de Guadalajara) and Felipe Villicaña-Vázquez (Centro Acuícola “Tizapán el Alto, Jalisco”) for their help in collecting or donating organisms from Lake Pátzcuaro and Lake Chapala. Joel P. Maya, Ivett M. Souza, E. Torres and C. Silva assisted in the identification of the species and laboratory work. Luis E. Fruns and Sharon Gorski gave invaluable help to the improvement of a previous draft of the manuscript. The first author was had with a CONACyT PhD. Scholarship 94151.

REFERENCES

- Alaye, R. N. 1993a. El pescado blanco (Género: *Chirostoma*) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, composición de especies. Cien. Pesq. 9: 113-128.
- Alaye, R. N. 1993b. Hematología de Aterínidos de aguas dulces: Género *Chirostoma* spp. del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Cien. Pesq. 10: 97-109.
- Alaye, R. N. 1996a. Estudios de polimorfismo de la hemoglobina para identificar especies del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Cien. Pesq. 13: 1-9.

- Alaye, R. N. 1996b. Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Mich. México. Cien. Pesq. 13: 10-17.
- Andrade, T. E. 1990. Desarrollo embrionario y larval de *Chirostoma patzcuaro* Meek 1902 y de los híbridos obtenidos por fecundación artificial con *Chirostoma grandocule* Steindachner 1894 (Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México. 88 p.
- Barbour, C. D. 1973a. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma*, Swaison. Tul. Stud. Zool. Bot. 19: 97-141.
- Barbour, C. D. 1973b. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). A species flock from the Mexican plateau. Copeia 3: 533-566.
- Barbour, C. D. & B. Chernoff. 1984. Comparative morphology and morphometrics of the pescados blancos (genus *Chirostoma*) from lake Chapala, México, p. 111-127. In A. A. Echelle & I. Kornfield (eds.). Evolution of Fish Species Flocks. Univ. Maine, Orono.
- Berlanga, R. C. A., A. R. Luna, M. R. Nepita & J. M. Vera. 1997. Estabilidad y diversidad de la composición de peces del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Rev. Biol. Trop. 45: 1553-1558.
- Carvalho, G. R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. J. Fish Biol. 43: 53-73.
- Chacón-Torres, A., M. R. Pérez & I. E. Muzquiz 1991. Síntesis Limnológica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Biología Acuática I. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México. 48 p.
- Chacón-Torres, A. 1993. Pátzcuaro un Lago Amenazado. Bosquejo Limnológico. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México. 144 p.
- Chacón-Torres, A. & C. Rosas-Monge. 1995. A restoration plan for pez blanco in Lake Pátzcuaro, México. Amer. Fish. Soc. Symp. 15: 122-126.

- Corti, M., R. S. Thorpe, L. Sola, V. Sbordoni & S. Cataudell. 1988. Multivariate morphometrics in aquaculture: A case study of six stocks of the common carp (*Cyprinus carpio*) from Italy. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45: 1548-1554.
- Cuadras, C. M. 1991. *Métodos de Análisis Multivariante*. Promociones y Publicaciones Universitarias, Barcelona. 664 p.
- De Buen, F. 1941. El Lago de Pátzcuaro. Recientes estudios limnológicos. *Rev. Geog. Inst. Panam. Geog. Hist.* 1: 20-44.
- Echelle, A. A. & A. F. Echelle 1984. Evolutionary Genetics of a "Species Flock:" Atherinid Fishes on the Mesa Central of Mexico, p. 93-110. *In*: A. A. Echelle & I. Kornfield (eds.). *Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. Maine, Orono.
- Estrada, R. M. C. 1991. Verificación a nivel experimental de los híbridos entre *Chirostoma estor* y *Chirostoma grandocule* (Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 113 p.
- Felsenstein, J. 1973. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Amer. J. Hum. Gen.* 25: 471-492.
- Greenwood, P. H. 1984. What is a Species Flock?, p. 13-19. *In* A. A. Echelle & I. Kornfield (eds.). *Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. Maine, Orono.
- Hartl, D. L. 1987. *A primer of Population genetics*. Sinauer Assoc. Mass. 141 p.
- Hebert, D. N. P. & M. J. Beaton. 1989. *Methodologies for Allozyme Analyses Using Cellulose Acetate Electrophoresis: A Practical Handbook*. Helena Lab. Texas. 32 p.
- Hillis, D. M. & J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 42: 182-192..

- Jiménez, B. M. L. 1992. Estimación de los parámetros poblacionales de la pesquería multiespecífica del género *Chirostoma* como grupo funcional en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. 105 p.
- Jiménez, B. M. L. & A. Gracia. 1995. Evaluación de la pesquería multiespecífica de charales (*Chirostoma* spp., Pisces, Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. An. Inst. Biol. Univ. Nac. Aut. Méx. Ser. Zool. 66: 205 - 231.
- Jordan, D. S. & J. O. Snyder. 1899. Notes on a Collection of Fishes from the Rivers of México, with description of twenty new species. Bull. U.S. Fish Comm. 19: 115-147.
- Jordan, D. S. & C. L. Hubbs. 1919. Studies in Ichthyology. A monographic review of the family Atherinidae or silversides. Lel. Stan. Jun. Univ. Pub. Univ. Ser. 40: 1-87.
- Miller, M. P. 1998. Tools for Population Genetic Analysis. Northern Arizona University, Flagstaff. Arizona.
- Moncayo, E. R. 1996. Estructura y Función de la Comunidad de peces de la Laguna de Zacapú, Michoacán, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Morelos, G. M. & A. M. Guzmán. 1995. Ictiofauna del lago, p. 49-71. In: La pesca en el lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional. Universidad de Guadalajara. Comisión Nacional del Agua. Jalisco, México
- Pérez, V. H. 1987. Contribución al conocimiento de la hibridación natural entre *Chirostoma estor* Jordan 1879 contra *Chirostoma grandocule* Steindachner 1894, en el Lago de Pátzcuaro, Mich., México. Tesis Licenciatura, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México. 48 p.
- Rodríguez, R. A. & L. C. Granado. 1987. Estudio morfológico del aparato mandibular en cinco especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Rev. Biol. Trop. 35: 97-106.
- Rodríguez, R. A. & L. C. Granado. 1988. Características del aparato bucal asociadas al régimen alimenticio en cinco especies coexistentes del género *Chirostoma* (Lago de Chapala, México). Rev. Chil. Hist. Nat. 61: 35-51.

- Rojas, C. P. M., M. L. Jiménez, M. P. Toledo & B. G. Mares. 1993a. Estimación de los parámetros de crecimiento y ciclo de madurez gonádica del charal blanco *Chirostoma grandocule*, Steindachner, 1894 (Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro, Mich. Cien. Pesq. 10: 69-77.
- Rojas, C. P. M., M. L. Jiménez, M. P. Toledo & B. G. Mares 1993b. Estudio de algunos aspectos biológicos del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro como base para su administración y cultivo. Instituto Nacional de la Pesca. CRIP. Patzcuaro, Michoacán. México. 48 p.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1995. Biometry. W. H. Freeman. New York.
- Toledo, P. 1987. Sobre la presencia del pescado blanco *Chirostoma lucius* (Pisces:Atherinidae) en el Lago de Pátzcuaro. Instituto Nacional de la Pesca, CRIP Pátzcuaro, Michoacán, México. 6 p.
- Ward, R. D., M. Woodwark & D. O. F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. J. Fish Biol. 44: 213-232.
- Weir, B. S. & C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evol. 38: 1358-1370.
- White, B. N. 1985. Evolutionary Relationships of the Atherinopsinae (Pisces:Atherinidae). Cont. Sci. Nat. Hist. Mus. 368: 1- 20.

TABLE 1

Species of Chirostoma analysed and collecting sites

Species Locality and collecting site	N (G)	N (M) &	Collecting date
<i>C. consocium consocium</i> 1b, 1c & 1d (CCha)	20	92	May, Aug. 1996 &
<i>C. estor estor</i> 1a, 1c, 1d & 1e (ECha) 3a & 3b (Eptz)	8 24	12 28	May & Aug. 1996 May 1996 & Aug.
<i>C. grandocule</i> 3c (GI-97) 3d (GJ-96)	21 20	50 50	May 1997 June 1996
<i>C. humboldtianum</i> 1e & 1d (HCha) 3a (HPtz) 2 (HZac) 4 (HZir)	8 30 6 6	7 39 6 40	Aug. 1997 Sept. 1999 May 1996 Sept. 1996
<i>C. lucius</i> 1d & 1e (LCha) 3b (LPtz)	9 7	11 8	May 1996 Aug. 1996
<i>C. promelas</i> 1a (PCha)	12	12	Apr. & Aug. 1996 &
<i>C. sphyraena</i> 1a (SCha)	5	12	Aug. 1996 & 1997
	N_{TOTAL} 176	367	

N= Total sample size: (G) for genetic analysis, (M) (m) formorphometric and meristic analysis. 1= Lake Chapala, Jalisco-Michoacán, 1a= Centro Acuicola "Tizapán el Alto", 1b= Agua Caliente, Mpio. Poncitlán, 1c= Mismaloya, Mpio. Tizapán, 1d= Tepeguaje, Mpio. Tuxcueca, 1e= Isla de Petatán, Mpio. Cojumatlán; 2= Zacapú Lagoon, Michoacán; 3= Lake Pátzcuaro Michoacán, 3a= Ojo de Agua, 3b= San Jerónimo, 3c= Ichupio, 3d= Janitzio; 4= Lake Zirahuén, Michoacán. Mpio= Municipality.

TABLE 2

Cumulated percentage of the variance in components I, II and III for multivariate analyses RA (Reciprocal Averaging) and PC (Principal Component)

Measure	Data	Multivariate analyses	Component I	Component II	Component III
Morphometric (M)	Original (o)	RA	70.1	95.6	96.5
		PC	56.4	91.9	94.2
	Log (i)	RA	74.1	92.8	96.8
		PC	89.6	97.2	98.6
	Proportion (ii)	RA	58.1	68.1	81.1
		PC	66.2	79.5	84.8
Meristic (m)	Original (o)	RA	48.1	67.3	84.5
		PC	71.5	86.9	94.7

TABLE 3

Classification results from DA with M (ii) data for C. humboldtianum and C. grandocule

Species/sample	HZir	HPtz	GI-97	GJ-96	N
HZir	26 (65%)	11	0	3	40
HPtz	3	35 (90%)	0	1	39
GI-97	0	0	43 (86%)	7	50
GJ-96	3	0	3	44 (88%)	50

Percent of cases correctly classified: 83%

TABLE 4

Classification results from DA with m (o) data for C. humboldtianum and C. grandocule

Species/sample	HZir	HPtz	GI-97	GJ-96	N
HZir	31 (77%)	8	0	1	40
HPtz	2	36 (92%)	0	1	39
GI-97	0	0	40 (80%)	10	50
GJ-96	0	0	14	36 (72%)	50

Percent of cases correctly classified: 80%

TABLE 5

Allelic frequencies of polymorphic loci for the seven species (13 samples) of the genus Chirostoma

Locus	CCha	ECha	EPtz	GI-97	GJ-96	HCha	HPtz	HZac	HZir	LCha	LPtz	PCha	Scha
G6pdh1	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.458	0.500
b	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.542	0.500
G6pdh2	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917	1.000
Gpi-1	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.275	0.375	0.854	1.000	1.000	0.812	0.350	0.583	0.750	0.167	1.000	0.333	0.400
c	0.700	0.625	0.146	0.000	0.000	0.188	0.417	0.250	0.250	0.833	0.000	0.667	0.600
d	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.233	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Gpi-2	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	0.300	0.000	0.583	0.000	0.000	0.250	0.700	0.250	0.417	0.000	0.000	0.333	0.400
b	0.700	0.375	0.375	1.000	1.000	0.625	0.300	0.417	0.583	0.167	1.000	0.667	0.600
c	0.000	0.625	0.042	0.000	0.000	0.125	0.000	0.333	0.000	0.833	0.000	0.000	0.000
Gpi-3	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000
b	1.000	1.000	0.937	1.000	1.000	0.750	0.750	0.917	0.917	1.000	1.000	0.958	1.000
c	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.083	0.083	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
d	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ldh-2	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	1.000	1.000	0.937	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.857	1.000	1.000
b	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.000	0.000
Pgm	(20)	(8)	(24)	(21)	(20)	(8)	(30)	(6)	(6)	(9)	(7)	(12)	(5)
a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
b	0.000	0.250	0.167	1.000	0.975	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
c	1.000	0.687	0.833	0.000	0.000	0.938	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
d	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
P_{99}	13	17	26	0.0	4	22	17	17	17	13	9	17	13
H_e	0.060	0.088	0.079	0.000	0.002	0.085	0.087	0.089	0.072	0.049	0.035	0.076	0.071

Aver.
14
0.060

A locus is polymorphic if the frequency of the most common allele does not exceed 99% (\pm S. E.). J-96 = Janitzio 1996; I-97 = Ichupio 1997; Cha = Lake Chapala; Zir = Lake Zirahuén; Zac = Centro Acuicola de Zacapu; Ptz = Lake Pátzeuaro; Sample size in parenthesis. P_S = Fihser's P among samples, P_P = Fihser's P among populations of *C. estor*¹, *C. humboldtianum*² and *C. lucius*³.

TABLE 6

Fixation indices (probability values associates with the F inbreeding coefficients, Weir & Cockerham 1984) for each sample and polymorphic loci

Species/sample	G6pdh-2	Gpi-1	Gpi-2	Gpi-3	Ldh-2	Pgm	Average F
CCha	--	+0.103*	+0.073*	--	--	--	+0.088
ECha	--	+0.000*	+0.000*	--	--	-0.296*	-0.099
EPtz	--	-0.150*	+1.000**	-0.045*		-0.179*	+0.156
HCha	--	-0.167*	+0.125*	-0.273*	--	--	-0.105
HPtz	--	-0.267*	+0.223*	+0.106*	--	--	+0.021
HZac	--	+0.211*	+0.318*	--	--	--	+0.264
HZir	--	-0.250*	+0.063*	--	--	--	-0.093
LCha	--	+0.636*	+0.636*	--	--	--	+0.636
LPtz	--	--	--	--	-0.091*	--	-0.091
PCha	+0.500*	-0.095*	-0.095*	--	--	--	+0.103
SCha	--	-0.600*	-0.600*	--	--	--	-0.600

* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$

TABLE 7

a) Estimates of genetic heterogeneity (θ_{POP} , θ_{SUBPOP} , F and f) for the 13 samples of *Chirostoma* analysed, b) for eight populations of three species

a)

θ_{POP}	θ_{SUBPOP}	F	f
0.247	0.360	0.138	-0.412
± 0.159	± 0.154	± 0.394	± 0.418

b)

Species (no. populations)	θ_{SUBPOP}	F	f
<i>C. e. estor</i> (2)	0.277	0.148	-0.228
	± 0.139	± 0.406	± 0.385
<i>C. humboldtianum</i> (4)	0.072	-0.217	-0.320
	± 0.032	± 0.304	± 0.293
<i>C. lucius</i> (2)	0.604	0.490	-0.829
	± 0.471	± 1.051	± 0.794

\pm SD . *99% Confidence interval with 10,000 bootstrapped replicates. $P < 0.001$

TABLE 8

Matrix of co-ancestry genetic identities (above) and distances (below) (Reynolds, 1985) for the 13 samples/populations of Chirostoma

Species	CCha	ECha	EPtz	GI-97	GJ-96	HCha	HPtz	HZac	HZir	LCha	LPtz	PCha	SCha
CCha	--	0.1674	0.2032	0.7838	0.7597	0.1566	0.1211	0.1071	0.0977	0.2756	0.3103	0.1655	0.1191
ECha	0.1833	--	0.2165	0.7558	0.7197	0.1604	0.2129	0.0563	0.1755	0.0480	0.3504	0.0006	-0.0382
EPtz	0.2272	0.2440	--	0.6007	0.5769	0.0469	0.1042	0.0488	-0.0047	0.3684	0.1807	0.2606	0.2050
GI-97	1.5315	1.1099	0.9180	--	0.0256	0.7419	0.6718	0.8068	0.8348	0.9303	0.9391	0.8126	0.8952
GJ-96	1.4260	1.2719	0.8601	0.0260	--	0.6997	0.6565	0.7656	0.7868	0.9044	0.8742	0.7873	0.8557
HCha	0.1703	0.1748	0.0480	1.3545	1.2028	--	0.1212	0.0625	0.0633	0.3414	0.0878	0.1911	0.1235
HPtz	0.1290	0.2394	0.1101	1.1142	1.0686	0.1292	--	0.0625	0.0633	0.2836	0.3105	0.2131	0.1733
HZac	0.1133	0.0579	0.0500	1.6440	1.4509	0.0645	0.0645	--	-0.0238	0.1965	0.1843	0.0640	-0.0023
HZir	0.1028	0.1929	-0.0047	1.8008	1.5454	0.0653	0.0653	-0.0235	--	0.3689	0.1257	0.2015	0.1383
LCha	0.3224	0.0492	0.4595	2.6629	2.3477	0.4177	0.3335	0.2187	0.4603	--	0.5786	-0.0030	0.0064
LPtz	0.3715	0.4314	0.1993	2.7990	2.0732	0.0919	0.3719	0.2038	0.1343	0.8642	--	0.3810	0.3611
PCha	0.1809	0.0006	0.6020	1.6748	1.5478	0.2120	0.2397	0.0662	0.2250	-0.0030	0.4797	--	-0.0630
SCha	0.1268	-0.0375	0.2294	2.2552	1.9357	0.1318	0.1903	-0.0023	0.1488	0.0065	0.4480	-0.0611	--

TABLE 9

Genetic variability of 23 loci of six species of the genus *Chirostoma*

Species	Sample size		Alleles/locus		P_{95}		H_e	
	I	II	I	II	I	II	I	II
<i>C. c. consocium</i> (Cha)	30	20	1.2 (0.1)	1.2 (0.10)	17	13	0.049 (0.026)	0.060 (0.033)
<i>C. e. estor</i> (Cha)	--	8	--	1.2 (0.11)	--	17	--	0.088 (0.041)
<i>C. e. estor</i> (Ptz)	--	24	--	1.3 (0.12)	--	26	--	0.079 (0.034)
<i>C. grandocule</i> (I-97)	--	21	--	1.0 (0.00)	--	0.0	--	0.000 (0.000)
<i>C. grandocule</i> (J-96)	10*	20	1.1 (0.1)	1.0 (0.04)	9	4	0.009 (0.006)	0.002 (0.002)
<i>C. humboldtianum</i> (Cha)	--	8	--	1.3 (0.11)	--	22	--	0.085 (0.038)
<i>C. humboldtianum</i> (Ptz)	--	30	--	1.3 (0.13)	--	17	--	0.087 (0.041)
<i>C. humboldtianum</i> (Zac)	10	6	1.2 (0.1)	1.3 (0.13)	22	17	0.026 (0.011)	0.089 (0.045)
<i>C. humboldtianum</i> (Zir)	--	6	--	1.2 (0.08)	--	17	--	0.072 (0.036)
<i>C. lucius</i> (Cha)	31	9	1.1 (0.1)	1.1 (0.07)	4	13	0.013 (0.012)	0.049 (0.028)
<i>C. lucius</i> (Ptz)	--	7	--	1.1 (0.06)	--	9	--	0.035 (0.026)
<i>C. promelas</i> (Cha)	8	12	1.1 (0.1)	1.2 (0.08)	9	17	0.028 (0.023)	0.076 (0.037)
<i>C. sphyraena</i> (Cha)	30	5	1.1 (0.1)	1.1 (0.07)	9	13	0.022 (0.14)	0.071 (0.039)
Average	19.8	13.5	1.1	1.2	12	14	0.022	0.061

A locus is considered polymorphic (P) if the frequency of the most common allele does not exceed 99%. I = Estimated from data of Echelle and Echelle (1984) and II = from the present study. Standard error is in parentheses. *Corresponds to organisms collected at Ihuatzio, Lake Pátzcuaro, Michoacán.

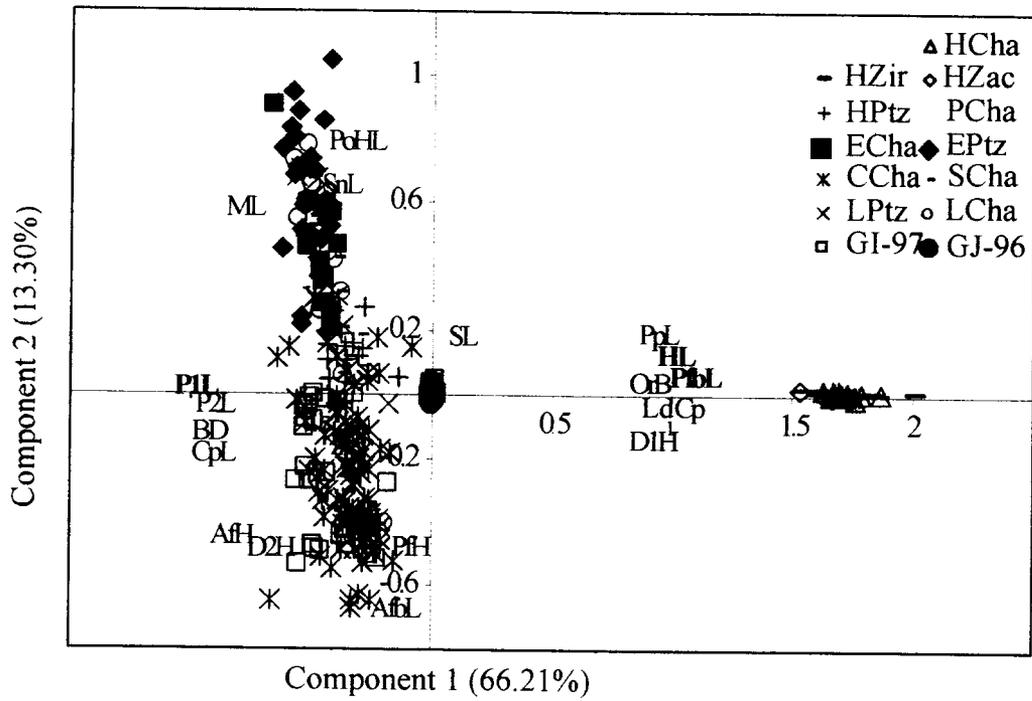


Fig. 2. Plot of first and second axis of a component analyses 19 (M ii) variables for 13 samples/populations of seven species of *Chirostoma*.

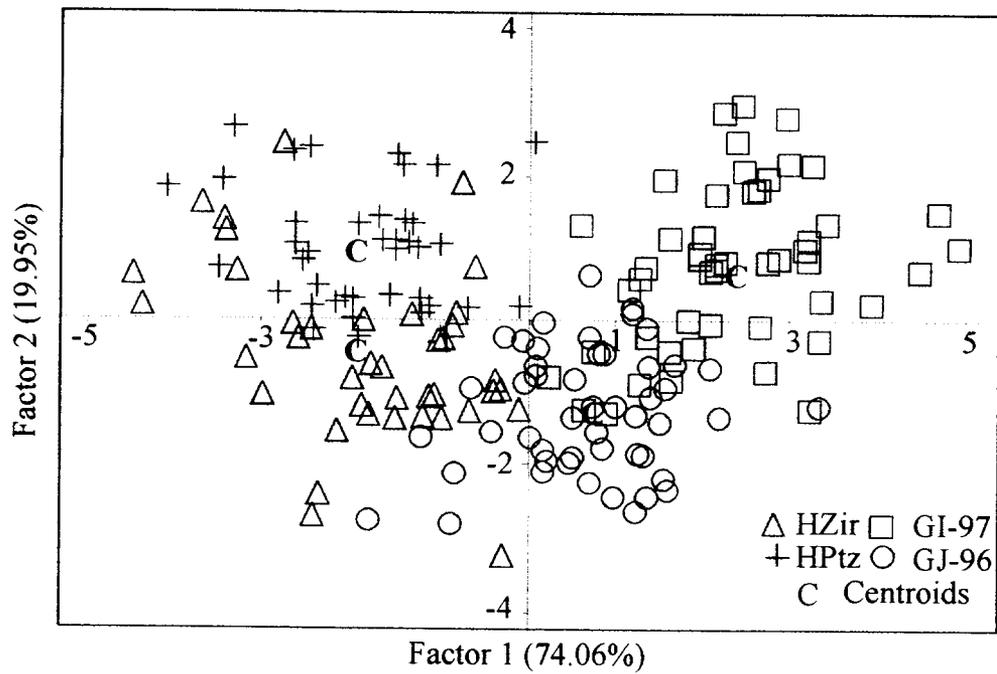


Fig. 3. Plot of first and second axis of a DA using 19 (M ii) variables and four samples/populations of two *Chirostoma* species, two for *C. humboldtianum*, HPTz and HZir and two for *C. grandocule* (GJ-96).

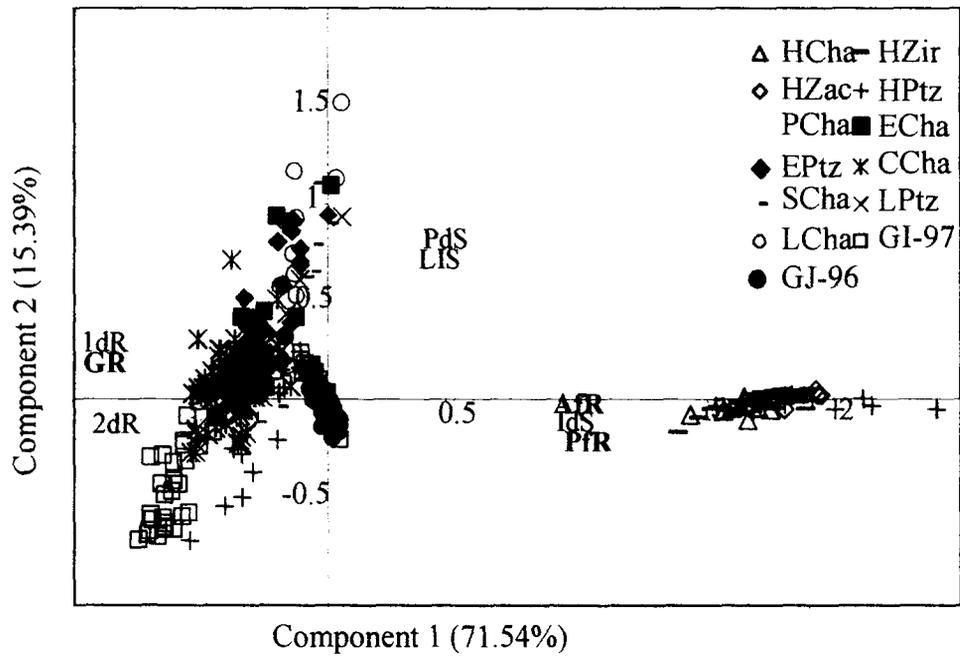


Fig. 4. Plot of first and second axis of a principal component analyses using eight meristic (m o) variables for 13 samples/populations of seven species of *Chirostoma*.

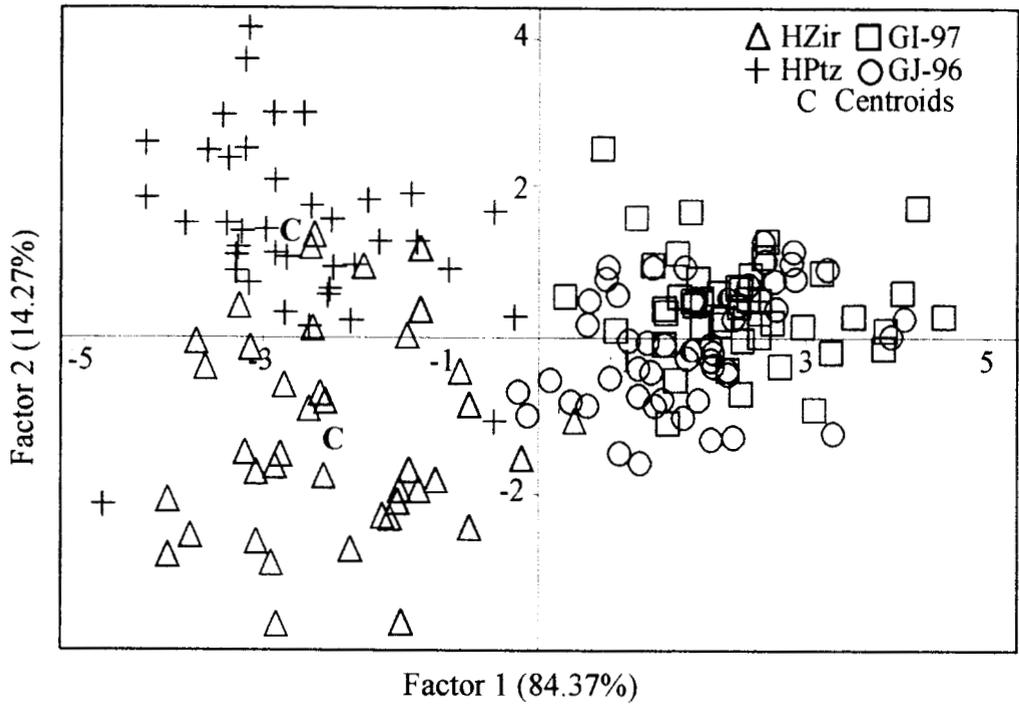


Fig. 5. Plot of first and second axis of a DA using eight meristic variables (mo) and four samples/populations of two *Chirostoma* species, two *C. humboldtianum*, HPTz and HZir and two for *C. grandocule* (GJ-96 & GI-97).

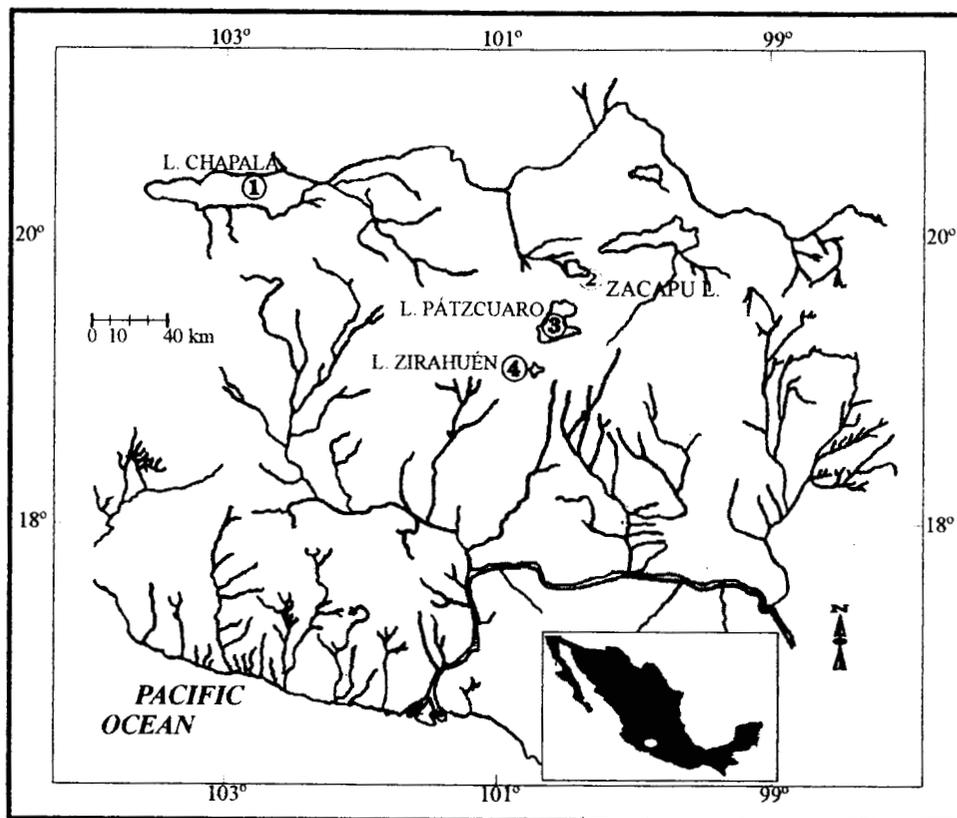


Fig. 1. Map that shows the lakes from which *Chirostoma* samples were obtained.

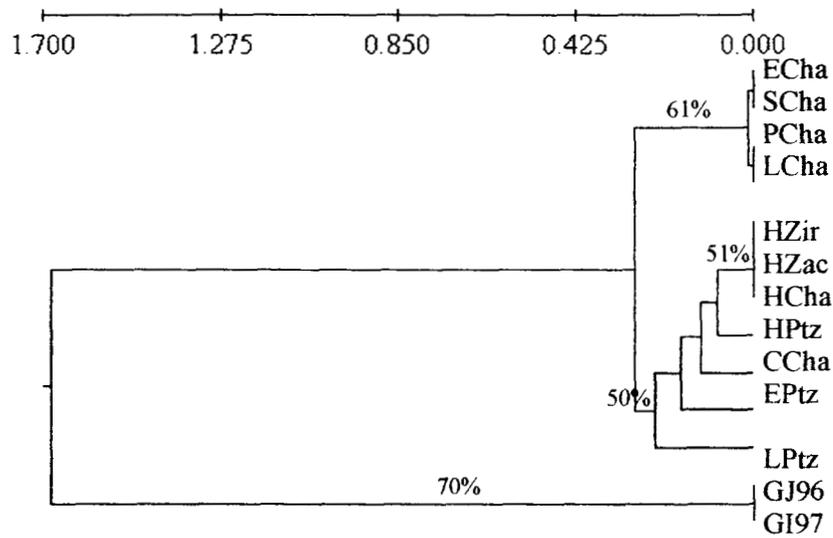


Fig. 6. UPGMA tree derived from the co-ancestry genetic distances (Reynolds 1985) of seven species of *Chirostoma* and based on 23 allozyme loci. Bootstrap values estimated from 1000 replications are reported when equal or higher than 50%.

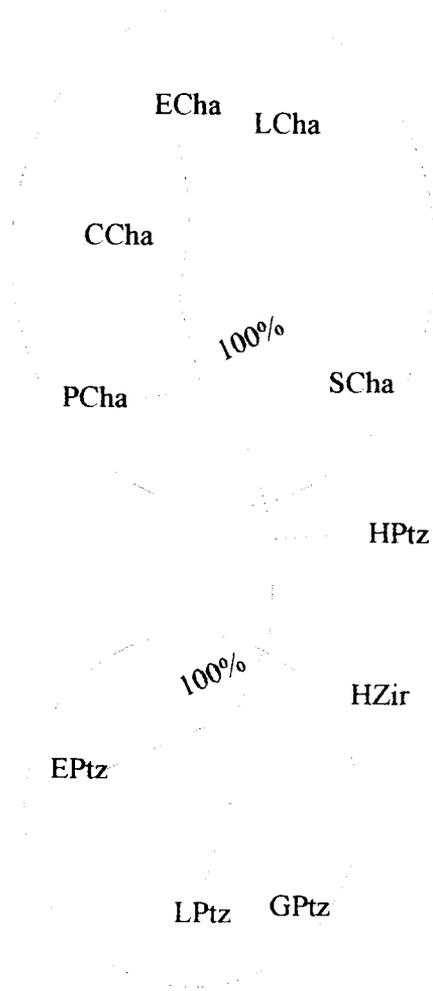


Fig. 7. Consensus tree of a bootstrapped maximum likelihood phenogram (100 runs) constructed from allele frequencies of 23 allozyme loci. Bootstrap results are shown for the nodes with a probability higher than 50%.

ANEXO 2

Procedimiento para la tinción específica de los sistemas que resolvieron loci polimórfico en las 13 especies y 3 subespecies de *Chirostoma* en el presente estudio

Gpi (Glucosa-6-fosfato isomerasa).

Tris HCl, pH 8.0

NAD

Fructosa-6-fosfato

MTT

PMS

G6PDH

Agar

Idh (Isocitrato deshidrogenasa).

Tris HCl, pH 7.0

NADP

DL-ácido isocítrico

MgCl₂

MTT

PMS

Agar

Ldh (Lactato deshidrogenasa).

Tris HCl, pH 7.0

NAD

Ácido DL-láctico

MTT

PMS

Agar

Pgm (Fosfatoglucomutasa).

Tris HCl, pH 8.0

NAD

MgCl₂

Solución de glucosa-1-fosfato

MTT

PMS

G6PDH

Agar

P6GDH (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa).

Tris HCl, pH 8.0

NADP

Glucosa 6-fosfato

MgCl₂

MTT

PMS

Agar

