



00381
17
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIOS CITOGENETICOS, ELECTROFORETICOS
Y DE ADN MITOCONDRIAL EN LA FAMILIA
GERREIDAE (PISCES) DEL ATLANTICO TROPICAL
OCCIDENTAL.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS (Biología)

p r e s e n t a

M. en C. José Ramón Ruiz Carús

DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL URIBE ALCOCER

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Estudios citogenéticos, electroforéticos y de ADN
mitocondrial en la Familia Gerreidae (Pisces)
del Atlántico Tropical Occidental.

t e s i s

que para obtener el grado académico de
Doctor en Ciencias

p r e s e n t a

M. en C. José Ramón Ruiz Carus

México, D.F.

1995

Reconocimientos

- Al Dr. Manuel Uribe Alcocer, por la dirección de esta tesis, por su paciencia, amistad y acertadas sugerencias por muchos años.
- A los Dres. Jorge Carranza Fraser, Virgilio Arenas Fuentes, Miguel Betancourt Rule, Adolfo Gracia Gasca, Judith Guzmán Rincón y Patricia Ostrosky Shejet, evaluadores y jurados de esta tesis por la cuidadosa revisión de versiones anteriores del trabajo y por sus valiosos comentarios.
- A Mimi por su amor, apoyo y confianza a través de los años y durante tantas vicisitudes científicas. A Ik por sus sonrisas y mil cosas más...
- A mis padres por brindarme con amor las herramientas que me han ayudado a perseguir mis ideales.
- A mis hermanos y a la memoria de mi abue Licha y tío Vite que con su ejemplo me siguen inspirando.

INDICE

	Página
Reconocimientos	i
Indice	ii
Lista de Tablas	iii
Lista de Figuras	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Introducción	1
Material y Métodos	11
Resultados	22
Discusión	45
Conclusiones	63
Bibliografía	65
Apéndice	85

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Información sobre los peces estudiados ...	15
Tabla 2. Sistemas alozímicos estudiados	19
Tabla 3. Resultados del análisis citogenético	24
Tabla 4. Frecuencias alélicas en los sistemas alozímicos de los gerreidos	38
Tabla 5. Matriz de distancias genéticas identidades genéticas	39
Tabla 6. Valores de heterozigosidad en los gerreidos estudiados	40
Tabla 7. Tamaño de los fragmentos del mtDNA producidos por la digestión con endonucleasas de restricción	43
Tabla 8. Número total de fragmentos del mtDNA y número de fragmentos comunes entre parejas de gerreidos	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización geográfica de las áreas de colecta	14
Figura 2. Cariotipo de <i>Eucinostomus argenteus</i>	25
Figura 3. Cariotipo-NOR de <i>E. argenteus</i>	26
Figura 4. Cariotipo de <i>Eucinostomus gula</i>	27
Figura 5. Cariotipo-NOR de <i>E. gula</i>	28
Figura 6. Cariotipo de <i>Eucinostomus harengulus</i>	29
Figura 7. Cariotipo-NOR de <i>E. harengulus</i>	30
Figura 8. Cariotipo de <i>Eugerres plumieri</i>	31
Figura 9. Cariotipo-NOR de <i>E. plumieri</i>	32
Figura 10. Electroferograma de LDH-c	34
Figura 11. Electroferograma de G3PDH	35
Figura 12. Dendograma de similitud genética	40
Figura 13. Separación del mtDNA en un gradiente de cloruro de cesio	41
Figura 14. Patrón electroforético de los fragmentos del mtDNA	42
Figura 15. Dendograma de la divergencia entre las secuencias del mtDNA	44

RESUMEN

Se han estudiado genéticamente peces de la familia Gerreidae provenientes de Puerto Progreso, México; Bahía de Tampa, EE.UU. y La Parguera, Puerto Rico.

Se analizaron los cromosomas de *Eucinostomus argenteus*, *E. gula*, *E. harengulus* y *Eugerres plumieri*. Las cuatro especies presentaron un complemento cromosómico de 48 elementos monorrámeos. Estos forman una serie que disminuye gradualmente de tamaño. La fórmula cromosómica resultó $2N=48=48t$. El número fundamental $NF=48$. Las regiones del organizador nucleolar (NOR) de *E. argenteus* y *E. harengulus* se localizaron en el primer par, mientras que *E. gula* y *E. plumieri* los presentaron en el cuarto par cromosómico. Los NOR's en *Eugerres* fueron de 10 a 20% mayores que en *Eucinostomus*.

Por medio de técnicas electroforéticas se analizaron diez sistemas alozímicos y con tres enzimas de restricción el ADN mitocondrial. Los perfiles de GPI-1^{músculo}, LDH - c y MDH^{hígado} permitieron la identificación alozímica específica de *Eucinostomus gula*, *Diapterus auratus* y *Eugerres plumieri*. Las relaciones filogenéticas basadas en distancia genética sugirieron que *Eugerres* y *Diapterus* se encuentra más cercanas evolutivamente. El peso molecular del ADN mitocondrial fue muy parecido entre los tres géneros. Los perfiles de digestión del ADN mitocondrial permitieron identificar a las tres especies. El dendograma de divergencia entre las secuencias del ADN mitocondrial tuvo la misma topología que aquella obtenida por similitud genética de alozimas. Estos estudios establecen las bases para la identificación específica mediante cromosomas, alozimas y patrones de restricción del ADN mitocondrial, y el análisis comparativo de los resultados permitió postular las relaciones filogenéticas.

Palabras clave: cromosomas, alozimas, DNA mitocondrial, taxonomía, filogenia, *Eucinostomus*, *Eugerres*, *Diapterus*, Gerreidae, Perciformes, Osteichthyes, Pisces, mojarra, Atlántico Occidental.

Chromosomes, allozymes and mitochondrial DNA in fishes of the family Gerreidae of the Western Tropical Atlantic.

ABSTRACT.

Gerreid fishes from Puerto Progreso, Mex., Tampa Bay, U.S.A. and La Parguera, Puerto Rico were studied genetically. Chromosomes of *E. argenteus*, *E. gula*, *E. harengulus*, and *E. plumieri* were analyzed. These four species showed a chromosome complement of 48 acrocentric elements. The chromosomes formed a series decreasing in size. Chromosome formula was $2N=48=48t$, and the fundamental number, $NF=48$. *E. argenteus* and *E. harengulus* were characterized by NOR's localized in the first chromosome pair, while in *E. gula* and *E. plumieri* were situated in the fourth chromosome pair. NOR's in *Eugerres* were 10 to 20% bigger than in *Eucinostomus* spp.

Electrophoretic studies were performed in 10 allozyme systems and in mtDNA digested with three restriction endonucleases. GPI-lmuscle, LDH-c and MDHliver loci were useful for taxonomic identification of *E. gula*, *D. auratus* and *E. plumieri*. The phylogenetic relationship based on genetic distance suggested that *Eugerres* and *Diapterus* were closely related. The three gerreid had similar mtDNA molecular weight. The endonuclease digestion profiles separated these genera, and the mtDNA dendrogram topology supports the phylogenetic relationship found with allozymes.

Taxonomic identification with chromosomes, allozymes and mtDNA restriction patterns was established.

Key words: chromosomes, allozymes, mtDNA, phylogeny, taxonomy, Gerreidae, Perciformes, Osteichthyes, Pisces, mojarra, Western Atlantic, Eucinostomus, Eugerres, Diapterus.

INTRODUCCION

En Ictiología, la diagnosis y diferenciación de las unidades sistemáticas de acuerdo a los métodos tradicionales, han dado más énfasis a los datos descriptivos de la forma, mientras que la información merística y el color ocupan un segundo término.

Al emplear estos métodos tradicionales, observamos que la variabilidad en cualquier población de peces, se extiende virtualmente a todas las características fenotípicas como son: color, número de rayos y espinas en aletas, número de vértebras, proporciones corporales, longitud, peso, etc. Si aunada a esta variabilidad consideramos que la forma *per se* y sus proporciones características se modifican continuamente durante la ontogenia (Parr, 1956), nos encontramos ante la posibilidad de identificar a algunos factores que limitan la capacidad discriminante de la taxonomía ictiológica tradicional.

Los métodos tradicionales en algunas ocasiones no permitieron identificar taxonómicamente especímenes con características intermedias. La sutileza de las diferencias morfológicas unida a la variación geográfica y ontogenética confundieron los límites de las especies. Por lo que es necesario utilizar métodos con mayor poder de resolución y objetividad. Las investigaciones genéticas ofrecen la objetividad requerida en estudios taxonómicos, permitiendo realizar análisis con mayor resolución que la lograda mediante métodos ictiológicos tradicionales. Es por ello que al través del análisis genético ha sido posible resolver algunos problemas taxonómicos de gran dificultad (Avice et al., 1990 y 1986; Avice y Saunders, 1984).

Dentro del amplio campo de la genética, la citogenética enfoca su estudio a las características genéticas y moleculares de los genes, en forma paralela con las características de los cromosomas y del ADN cromosómico usando microscopía (Avers,

1980). La información citogenética provee una línea independiente de evidencia mediante la cual, es posible alcanzar conclusiones objetivas y precisas acerca del sistema genético. Las aberraciones estructurales y los cambios numéricos en el genoma, proveen información con la que las actividades genéticas pueden ser detectadas e interpretadas.

En la clase Písces, los estudios citogenéticos se han incrementado desde 1960, pudiendo atribuirse en gran medida al mejoramiento en la tecnología para obtener y estudiar los cromosomas (Feldberg et al., 1992; Moreira Fihlo y Bertollo, 1991; Ozouf-Costaz y Foresti, 1992; Klinkhardt, 1991b; Gold et al., 1990; Fan y Fox, 1990; Baksi y Means, 1988; Reddy y John, 1986; Chourrot y Happe, 1986; Chourrot, 1986).

La citogenética ictiológica ha podido ser aplicada a las siguientes áreas de interés:

a. Clasificación taxonómica.

Las dificultades de la identificación taxonómica de las especies, han podido resolverse empleando características cromosómicas para la identificación crítica de las especies (Grigoryan y Vasil'ev, 1993; Vitturi et al., 1991; Sola et al., 1990; Hochberg y Erdmann, 1988; Portela et al., 1988; Uribe Alcocer y Ramirez Escamilla, 1989; Uribe Alcocer et al., 1988; Uwa y Parenti, 1988; Turner et al., 1985; Ueno, 1984; Gold, 1981).

b. Biogeografía.

Los estudios citogenéticos han resaltado la correlación entre la distribución geográfica, el polimorfismo cromosómico y las ploidías (Arefjev, 1991; García et al., 1987; Vitturi et al., 1986a; LeGrande, 1981, 1980 y 1975; Schultz, 1980; Black y Howell, 1978; Chen, 1971).

c. Acuacultura.

La hibridización se ha utilizado para el mejoramiento en algunos stocks de peces. El éxito de la hibridización ha podido predecirse al través de investigaciones cromosómicas de las especies que serán apareadas (Na-Nakorn et al., 1993; Ueda, 1988; Kinkaid, 1983; Kirpichnikov, 1981). Por otra parte, en algunas especies domesticadas mediante selección, se han generado cambios hereditarios, y los estudios citogenéticos han ayudado a entender estos procesos de adaptación y selección (Chourrot et al., 1986; Chincjiang y Rongde, 1986; Thorgaard et al., 1982; Shelton et al., 1981; Roberts, 1970; Gall, 1969; Rees, 1964).

Los estudios de citogenética ictiológica clásica se han visto limitados al uso de bandas-C o Centrómero, y/o bandas-NOR, o Región del Organizador Nucleolar (Nucleolus Organizer Region), debido a las dificultades para obtener las bandas-G o Giemsa y bandas-R o Reversas. Pese a ello, en algunos casos ha sido posible obtener éstas últimas (Gold et al., 1990; Sola et al., 1984; Blaxhall, 1983), lográndose así la identificación de cromosomas individuales, de translocaciones, de inversiones y deleciones cromosómicas, siendo posible entender algunas relaciones filogenéticas y algunos procesos de especiación, con base en estos reacomodos cromosómicos.

Debido a la revolución tecnológica que se está realizando en la biología molecular, existe en la citogenética ictiológica clásica, una tendencia que puede catalogarse como una evolución hacia la microcitogenética. En ella el empleo de técnicas tales como: bandeo de alta resolución (Giles et al., 1988; Lin y Ojima, 1987; Liu, 1986; Lockwood et al., 1986), bandeo empleando endonucleasas de restricción (Hartley, 1991a y 1991b; Sánchez et al., 1990; Ferreira et al., 1989; Lloyd y Thorgaard, 1988), el uso de hibridización de ácidos nucleicos y el empleo de sondas moleculares específicas (Turner et al., 1992; Han et al., 1992; Bentzen et al., 1991; Lloyd et al., 1989; Fields et al., 1989), nos dificultan establecer con claridad los límites entre la

citogenética ictiológica clásica y la genética molecular. Por ello en este trabajo se agrupa a todo este conjunto de estudios dentro de la genética ictiológica molecular. Estas nuevas tecnologías vienen a complementar al análisis citogenético clásico, y permiten postular causas y modelos para explicar los procesos que se realizan a nivel cromosómico. Además de extender el ámbito de la genética clásica al incluir a la herencia extracromosómica. La genética ictiológica molecular abarca a la microcitogenética e incluye el análisis de alozimas y el estudio del ADN mitocondrial.

El análisis de alozimas por electroforesis, utiliza la propiedad físico-química de las proteínas de presentar carga eléctrica neta. Una mezcla de proteínas en solución, se separa en un medio de soporte como gel de almidón o poliacrilamida, por el paso de una corriente eléctrica directa. La movilidad de las proteínas en el medio de soporte, depende de su carga eléctrica, tamaño y conformación molecular. Una vez separadas, las proteínas son identificadas con una tinción específica de su actividad enzimática, y los resultados de la identificación se interpretan bajo los principios mendelianos que permiten reconocer a las formas alélicas o alozimas. La técnica de electroforesis ha sido descrita detalladamente por Murphy et al. (1990), Ayala (1978), y Lewontin (1974).

Las variabilidades inter e intraespecíficas en peces han sido estudiadas desde el punto de vista molecular por medio del análisis electroforético de proteínas. Estos análisis han permitido comparar frecuencias alélicas (Van der Walt et al., 1993; Bohlmeier y Gold, 1991; Creech, 1991; Lee y Chao, 1990; Fevolden y Haug, 1988; Utter et al., 1987; Pezold y Grady, 1989; Crabtree y Buth, 1987; Sprague et al., 1963; Sindermann, 1962), y en peces de importancia comercial se ha demostrado que algunos stocks pesqueros están subdivididos en poblaciones o grupos menores distinguibles genéticamente. Estudios cromosómicos recientes han confirmado que la mezcla entre tales grupos es

pequeña (Phillips et al., 1989 y 1988). Pese al gran número de estudios realizados con análisis electroforético de proteínas, es necesario puntualizar que en ellos se subestima la variabilidad genética, pues no todas las substituciones de aminoácidos dan como resultado cambios detectables electroforéticamente. Lewontin (1974) calculó que sólo un tercio de dichas substituciones son detectadas. Por otra parte la identidad electroforética no implica identidad genética a nivel de ADN (Utter et al., 1987). Pese a estas limitaciones este tipo de análisis no tiene comparación en cuanto al volúmen de información que puede obtenerse a corto plazo, y a su capacidad para detectar zonas de hibridación (Berrebi et al., 1993; Whitmore, 1983; Martin y Richmond, 1973).

Al estudiar grupos evolutivamente cercanos, la relativa insensibilidad del análisis electroforético de alozimas, alentó la búsqueda de otros métodos. Los procedimientos para estudiar el ADN mitocondrial (mtDNA) han sido una de las nuevas metodologías. En esta técnica, los fragmentos producidos por digestión del mtDNA total con endonucleasas de restricción, que cortan a la molécula de mtDNA en secuencias específicas, son sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Los patrones electroforéticos informan sobre el número de fragmentos, sus pesos moleculares y las secuencias del mtDNA de los sitios de restricción. Esta información permite calcular valores de divergencia, entre las secuencias de taxa diferentes. El análisis de mtDNA resulta adecuado para comparar especies filogenéticamente cercanas, debido a que el mtDNA acumula mutaciones de manera relativamente rápida (Brown, 1983; Brown et al., 1979). Esta técnica ha sido descrita en detalle por Dowling et al. (1990) y Lansman et al. (1981). Los análisis del ADN mitocondrial han producido resultados sorprendentes (Sturmbauer y Meyer, 1993; Avise et al., 1990; Tzeng y Shen, 1990; Gonzalez Villaseñor y Powers, 1990; Gonzalez Villaseñor et al., 1986; Avise y Saunders, 1984; Ferris et al., 1982), sin embargo, la carencia de información sobre los procesos de replicación y reparación del ADN mitocondrial, su

dinámica de cambio, el grado de heteroplasma individual y la aceptada transmisión, por línea materna limitan su utilidad. Pese a ello, problemas taxonómicos controvertidos que por muchos años estuvieron sin solución, como el de *Anguilla rostrata* versus *Anguilla anguilla*, han sido resueltos mediante análisis del ADN mitocondrial (Avisé et al., 1990 y 1986).

Resulta obvio que la genética ictiológica está desempeñando un papel importante en la biología actual. Las observaciones del material genético en los cromosomas, en las mitocondrias o el estudio de las proteínas codificadas por ellos son potencialmente de gran valor en estudios de sistemática, evolutivos, sobre manejo de poblaciones pesqueras (Bartlett y Davidson, 1991; Dahle, 1991; Wakeman y Ramsey, 1988; Gold et al., 1988a; Al-Sabti, 1984; Landolt y Kocum, 1983; Allendorf y Phelps, 1981; Alink et al., 1980) y en otros problemas biológicos que requieren de dicha información (Ruiz-Carús, 1993 y 1983; Meffe, 1987 y 1986; Phillips et al., 1986a; Pechan et al., 1986; Imai et al., 1986; Graham et al., 1985).

En la familia Gerreidae-Pisces, el diagnóstico convencional no permite la ubicación de cierto número de especímenes con características intermedias, ya que la sutileza de las diferencias interespecíficas, y a veces intergenéricas, unida a la variación geográfica y ontogenética tienden a confundir los límites de las especies. Por ello varios especialistas en este grupo (Deckert y Greenfield, 1987; Matheson y McEachran, 1984; Matheson, 1983; Fisher, 1978; Hoese y Moore, 1977; Deckert, 1973; Curran, 1942) han manifestado la necesidad de una revisión en la sistemática de esta familia.

Los peces de la familia Gerreidae del Atlántico tropical americano, comúnmente llamados mojarras, en la literatura reciente han sido reconocidos hasta en seis géneros: *Diapterus* Ranzani, 1840; *Eugerres* Jordan y Evermann, 1927; *Moharra* Poey, 1875; *Eucinostomus* Baird y Girard, 1855; *Gerres* Quoy y Gaimard, 1824 y *Ulaema* Jordan, 1895. Curran (1942) en su tesis doctoral

reconoció en *Lepidochir* a otro género más; sin embargo, sus estudios no llegaron a publicarse formalmente.

La validez de estos géneros se ha disputado en repetidas ocasiones, como, por ejemplo, en los dos casos siguientes: Meek y Hildebrand (1925) reconocieron únicamente cuatro de los seis géneros mencionados, situando a *Moharra* y *Eugerres* dentro del género *Gerres*. Por otra parte, Robins et al. (1991) en su lista de nombres comunes y científicos consideran la existencia de sólo tres géneros. Para ellos *Diapterus* incluye a *Moharra* y a *Eugerres*, completando su arreglo sistemático de los gerreidos con la inclusión de los géneros *Gerres* y *Eucinostomus*.

El diferente grado de importancia dado a los caracteres usados en la identificación taxonómica, junto a la subjetividad de algunas descripciones morfológicas han ocasionado confusión en la sistemática y taxonomía de los gerreidos. Pese a ello de manera general podemos resumir, y decir que aquellas mojarras caracterizadas por presentar el preopérculo aserrado en sus márgenes inferior y posterior, han sido asignadas al género *Diapterus* (Robins et al., 1991; Alvarez Del Villar, 1970; Meek y Hildebrand, 1925); o bien a una combinación de *Diapterus*, *Eugerres* y *Moharra* (Mago Leccia, 1970; Cervigón, 1966; Schultz, 1949). Mientras que aquellas con preopérculo liso han sido ubicadas en *Gerres* y *Eucinostomus* (Aguirre León y Yáñez Arancibia, 1986; Aguirre León et al., 1982; Hoese y Moore, 1977; Fisher, 1978; Cervigón, 1966).

Actualmente se acepta que la carencia del tercer elemento espinescente de la aleta anal, no es razón suficiente para darle rango de género a *Moharra* y es por ello que Deckert y Greenfield (1987) y Deckert (1973) lo colocan dentro de *Diapterus*. Usando el mismo criterio estos autores sitúan a *Ulaema* dentro de *Eucinostomus*.

Deckert y Greenfield (1987) consideran que *Eugerres* está representado en el Atlántico americano por tres especies: *E. brasilianus* (Valenciennes, 1830), *E. mexicanus* (Steindachner, 1863), y *E. plumieri* (Valenciennes, 1830), mientras que *Diapterus* está constituido por dos especies *D. auratus* Ranzani, 1840 y *D. rhombeus* (Valenciennes, 1830). Todas estas especies son identificables por diferencias en el número de dientes faríngeos y el número de espinas y rayos de la aleta anal.

Las diferencias entre *Eugerres* y *Diapterus* son la presencia en la primera de doce rayas oscuras longitudinales y dientes faríngeos grandes casi molariformes, mientras que *Diapterus*, que es de color plateado uniforme, tiene dientes faríngeos pequeños y delgados. La intensidad de las rayas longitudinales oscuras en *Eugerres* varía con la distribución geográfica y el desarrollo ontogenético.

Gerres cinereus (Walbaum, 1792) es la única especie del género *Gerres* en el Atlántico americano, y se identifica por la presencia de 7-8 barras verticales de color azulado verdoso, éstas ocasionalmente ausentes en ejemplares jóvenes; sus aletas pectorales y anal son de color amarillo, y su vejiga natatoria terminada en un par de divertículos. Esta especie es de fácil identificación, con excepción de aquellos ejemplares menores de 40 mm en longitud total. En este caso puede usarse la proporción de la segunda espina anal que es mayor en *Gerres* que en *Eucinostomus* (Matheson, 1983).

El género *Eucinostomus* Baird, 1855 considerado por Matheson y McEachran (1984) como el más problemático taxonómicamente, difiere de otros gerreidos en poseer la segunda espina interhemal hueca con forma cónica. Esta está formada por dos pterygióforos modificados, que encierran a la parte posterior de la vejiga natatoria (Picciolo, 1960; Curran, 1942). En el género *Eucinostomus* se ha utilizado la altura del cuerpo para la identificación de las especies, originándose una sobreposición de las proporciones que dificulta la identificación, muy

especialmente de individuos juveniles (Matheson y McEachran, 1984; Bohlke y Chaplin, 1968; Curran, 1942). Dentro de este grupo con cono interhemal, Matheson y McEachran (1984) y Matheson (1983) reconocen siete especies: *E. havana* (Nichols, 1912) con aletas pectorales densamente escamadas y aleta anal con tres espinas; *E. lefroyi* (Goode, 1874) con aletas pectorales sin escamas y dos espinas en la anal; *E. melanopterus* (Blecker, 1863) con dorsal caracterizada por presentar una mancha negra en su región más alta y nueve branquiespinas en el primer arco. Las cuatro especies restantes: *E. gula* (Quoy y Gaimard, 1824), *E. argenteus* Baird y Girard, 1855, *E. harengulus* Goode y Bean, 1879 y *E. jonesi* (Günther, 1879), son definidas en base a la anchura del cuerpo, su patrón de escamas en el surco premaxilar y la longitud de la segunda espina anal.

Los trabajos de Deckert y Greenfield (1987), Deckert (1973), Matheson y McEachran (1984) y Matheson (1983) han presentado un arreglo sistemático de las especies del Atlántico tropical americano, con las características para su identificación taxonómica. Estos estudios incluyeron un número elevado de ejemplares, y entre ellos a los especímenes tipo. Sus muestras representaron parte del desarrollo ontogenético así como un área geográfica amplia. Sin embargo, y a pesar de estos esfuerzos para entender la taxonomía y sistemática de los gerreidos, éstas continúan siendo discutibles y controversiales. El autor de esta tesis considera que la taxonomía y sistemática de este grupo requieren ser revisados, con base en información que permita una mayor objetividad que la brindada por el análisis ictiológico tradicional. La revisión con información más objetiva pudiera facilitarnos la identificación taxonómica, y ayudarnos a entender las relaciones filogenéticas en esta familia de peces de gran importancia ecológica y con relevancia en la pesquería artesanal (Albaret y Desfossez, 1988; Aguirre León y Yañez Arancibia, 1986; Kerschner et al., 1985; Aguirre León et al., 1982; Cyrus y Blaber, 1984 y 1983; Baez Hidalgo, 1980; Fisher, 1978; Lasserre y Toffart, 1975; Brook, 1977; Eskinazi, 1972; Austin, 1971).

Dado que actualmente se carece de conocimientos sobre las relaciones filogenéticas en la familia Gerreidae-Pisces, que su sistemática es incierta; y que la identificación taxonómica de individuos juveniles y de aquellos de grupos que se encuentran en áreas geográficas amplias es relativamente difícil, el objetivo de esta tesis ha sido realizar estudios citogenéticos clásicos y de genética molecular en algunas especies de la familia Gerreidae-Pisces, a fin de generar información para enriquecer las bases para la identificación taxonómica, y mediante el análisis comparativo de los resultados obtener una perspectiva preliminar de las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas.

Basando la identificación taxonómica de las especies en los criterios de Deckert y Greenfield (1987), Deckert (1973), Matheson y McEachran (1984) y Matheson (1983), se obtuvo información citogenética clásica en las siguientes especies de la familia Gerreidae-Pisces: *Eucinostomus argenteus* Baird, 1855, *Eucinostomus gula* (Cuvier, 1830), *Eucinostomus harengulus* Goode y Bean, 1879 y *Eugerres plumieri* (Cuvier, 1830). Las especies de *Eucinostomus* fueron seleccionadas dentro de un marco geográfico amplio. Con ello se pretendió aumentar el poder de resolución del análisis de especies muy similares morfológicamente. La comparación entre *Eucinostomus* y *Eugerres* caracterizó los criterios citogenéticos. Los análisis moleculares comprendieron estudios electroforéticos de alozimas, y ADN mitocondrial con endonucleasas de restricción de: *Eucinostomus gula*, (Cuvier, 1830), *Diapterus auratus* Ranzani, 1842 y *Eugerres plumieri* (Cuvier, 1830). Se seleccionaron estas especies para obtener una perspectiva global de la familia, y los especímenes representaron un área geográfica amplia para minimizar los efectos de convergencias y adaptabilidad.

MATERIAL Y METODOS

A) Material

Los especímenes utilizados en este estudio se colectaron en tres áreas geográficas, a saber: Puerto Progreso localizado en el estado de Yucatán, La Parguera situada en la costa suroeste de Puerto Rico y la Bahía de Tampa de la costa oeste de la Florida, USA (Figura 1).

Cuando las condiciones fisiográficas lo permitieron las mojaras se capturaron con un chinchorro playero de 50 m de longitud, o bien en las zonas de manglares con una atarraya de 2.5 m de diámetro, teniendo ambas redes una malla con luz de 1.5 cm.

Los peces colectados para realizar los estudios citogenéticos fueron transportados vivos al laboratorio. Allí se les mantuvo por 48 Horas en acuarios que asemejaban las condiciones del sitio de colecta con la finalidad de disminuir el stress ocasionado por el manejo y la captura. Los ejemplares destinados para análisis electroforético de alozimas fueron sacrificados en el sitio de colecta e inmediatamente se obtuvieron las muestras de: músculo, hígado y ojo. Estas se mantuvieron a -10° C en botellas refrigerantes por 1-2 días durante su transporte al laboratorio. Una vez ahí, fueron transferidas y mantenidas a -20° C hasta ser procesadas 5-6 semanas más tarde. Para el análisis del ADN mitocondrial se emplearon las gónadas que inmediatamente se sumergieron en Nitrógeno líquido (-70° C) en donde se les mantuvo hasta ser analizadas 4-5 meses más tarde.

Una vez obtenidas las muestras de tejidos, los especímenes fueron fijados durante dos semanas en formalina acuosa al 10% amortiguada con fosfatos (0.1 M). Posteriormente se colocaron en agua durante 24 Horas, y se les preservó en isopropanol al 50 %. Se procedió a la identificación taxonómica de acuerdo a los criterios de Deckert y Greenfield (1987), Deckert (1973),

Matheson y McEachran (1984) y Matheson (1983). Los especímenes están depositados en la Colección Ictiológica del Florida Marine Research Institute, en Saint Petersburg, Florida, USA. Los números de colecta correspondientes son: RRC81-3, RRC81-4, RRC86-2, RRC86-3, RRC86-5, RRC87-9, RRC87-14, RRC87-15, RRC87-16, RRC87-17, RRC87-24, RRC87-27, RRC88-2, RRC88-3, RRC88-4. Los datos de las colectas han sido registrados en la Tabla 1.

B) Métodos

1) Citogenética convencional

Los estudios citogenéticos se realizaron en cuatro especies de mojarra. Estas especies con el número de ejemplares correspondientes fueron: *Eucinostomus argenteus* (6), *Eucinostomus harengulus* (4), *Eucinostomus gula* (4) y *Eugerres plumieri* (4). El método para obtener cromosomas mitóticos fue la técnica directa de epitelio branquial y riñón mediante el siguiente procedimiento: Los especímenes fueron inyectados epaxialmente con colchicina 0.3 µg/ml con una dosis de 0.1 ml por gramo de peso. Los especímenes fueron sacrificados después de 4 a 6 horas; los dos primeros arcos branquiales del lado izquierdo del espécimen, así como los riñones fueron extirpados y colocados en solución salina BSS (Apéndice) para eliminar mucus y sangre. Una vez logrado esto se les transfirió a un homogenizador de tejidos con pistón liso de teflón (Cole-Parmer 3431-D70-AA) que contenía 5 ml de BSS y suavemente con 3-5 pulsos del pistón se les homogenizó. La suspensión celular fue transferida a un tubo de centrifuga y se centrifugó por 10 minutos a 1000 RPM. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en solución hipotónica de KCl 0.056 % en la que se mantuvo por 30 min a los riñones y por 45-60 min al epitelio branquial. El sobrenadante fue desechado y se procedió a la fijación del material con una solución fresca de metanol-ácido acético glacial 9:1 agitando suavemente en un Vórtex. Después de mantenerse en esta solución de 5-10 min se centrifugó a 800 RPM/10 min, desechándose el

sobrenadante y adicionando muy lentamente 5 ml de ácido acético glacial. Se incubó de 6-7 min se centrifugó nuevamente por 10 min a 800 RPM y se desechó el sobrenadante para añadir metanol-ácido acético 3:1, resuspendiendo el material celular en un volumen pertinente a la cantidad del material celular obtenido. Las preparaciones se hicieron colocando 2-3 gotas de la suspensión celular en un portaobjetos sumergido previamente en agua desionizada a 26° C, siendo la humedad relativa en el laboratorio de 56 %. Las preparaciones se secaron al aire. Al día siguiente se les colocó en un horno a 60-65° C por 24 h para finalmente teñirlas con una de las tres técnicas utilizadas. En la primera se tiñen con Giemsa al 4-5 % en buffer de fosfatos 0.01 M con pH de 6.8 durante 5 min, a continuación las preparaciones fueron lavadas en agua desionizada y secadas con una pistola de aire.

b.2) Bando G (Giemsa)

La segunda técnica fué para obtener Bandas-G, y para ello las preparaciones se incubaron en 2X SSC (Apéndice) durante 2 h a 60° C en un vaso de Coplin. Posteriormente se lavaron individualmente con una solución de NaCl al 0.9 %, se les escurrió para después colocarlas en una solución que contiene el colorante y la tripsina: 1.5 ml de Giemsa en 45 ml de buffer de fosfatos 0.01 M con pH de 7.2 + 600 µl de solución stock de tripsina. El stock de tripsina contiene 2.5 % de tripsina en un volumen de 3 ml y debe prepararse diariamente. Después del tratamiento las preparaciones se lavaron en agua desionizada y se secaron con pistola de aire. En esta técnica se ensayaron diferentes temperaturas: 25, 27, 30, 33, 35 y 37° C, diferentes tiempos de digestión: 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 y 180 segundos, y diferentes concentraciones del stock de tripsina: 1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 %.

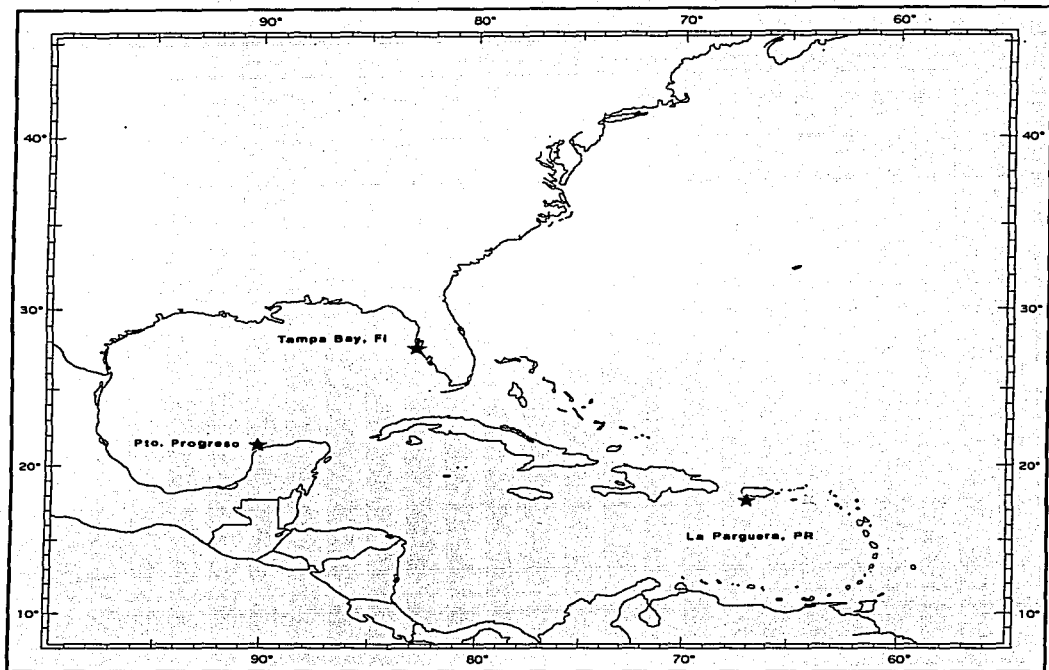


Figura 1. Localización geográfica de las áreas de colecta

ESPECIE	CODIGO	COLECTADO EN	COORDENADAS	FECHA	VIAJE DE COLECTA	LONG. EST.
<i>E. argenteus</i>	EUC 2	La Parguera, Puerto Rico	17°58'N, 67°03'W	Jun 14 81	RAC 81-3	123
<i>E. argenteus</i>	EUC 3	La Parguera, Puerto Rico	17°58'N, 67°03'W	Jun 20 81	RAC 81-4	127
<i>E. argenteus</i>	EUC 6	Clearwater Beach, Fl	27°59'N, 83°50'W	Sep 07 87	RAC 87-14	91
<i>E. argenteus</i>	EUC 8	Pass a Grille Beach, Fl	27°41'N, 83°44'W	Sep 21 87	RAC 87-17	84
<i>E. argenteus</i>	EUC 9	Pass a Grille Beach, Fl	27°41'N, 83°44'W	Sep 21 87	RAC 87-17	84
<i>E. argenteus</i>	EUC 12	Pass a Grille Beach, Fl	27°41'N, 83°44'W	Sep 21 87	RAC 87-17	61
<i>E. harengulus</i>	EUC 4	Little Manatee River, Fl	27°43'N, 82°38'W	May 24 87	RAC 87-9	65
<i>E. harengulus</i>	EUC 5	Little Manatee River, Fl	27°43'N, 82°38'W	May 24 87	RAC 87-9	82
<i>E. harengulus</i>	EUC 10	Pass a Grille Beach, Fl	27°41'N, 83°44'W	Sep 21 87	RAC 87-17	81
<i>E. harengulus</i>	EUC 13	Pass a Grille Beach, Fl	27°41'N, 83°44'W	Sep 21 87	RAC 87-17	74
<i>E. gula</i>	EUC 7	Fort DeSoto Park, Fl	27°37'N, 83°44'W	Sep 13 87	RAC 87-15	76
<i>E. gula</i>	EUC 11	Pass a Grille Beach, Fl	27°41'N, 83°44'W	Sep 21 87	RAC 87-17	68
<i>E. gula</i>	MOJ 15	Clearwater Beach, Fl	27°59'N, 83°50'W	Sep 20 87	RAC 87-16	87
<i>E. gula</i>	MOJ 16	Clearwater Beach, Fl	27°59'N, 83°50'W	Sep 20 87	RAC 87-16	95
<i>E. plumieri</i>	EUG 1	Boca Ciega Bay, Fl	27°42'N, 83°41'W	Dic 05 87	RAC 87-24	22
<i>E. plumieri</i>	EUG 2	Boca Ciega Bay, Fl	27°42'N, 83°41'W	Dic 05 87	RAC 87-24	206
<i>E. plumieri</i>	EUG 3	Boca Ciega Bay, Fl	27°42'N, 83°41'W	Dic 05 87	RAC 87-24	182
<i>E. plumieri</i>	EUG 4	Coffee Pot Bayou, Fl	27°49'N, 82°27'W	Dic 13 87	RAC 87-27	186
<i>E. gula</i>	GUL 11	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	161
<i>E. gula</i>	GUL 12	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	164
<i>E. gula</i>	GUL 13	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	150
<i>E. gula</i>	GUL 14	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	165
<i>E. gula</i>	GUL 15	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	168
<i>E. gula</i>	GUL 16	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	130
<i>E. gula</i>	GUL 17	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	154
<i>E. gula</i>	GUL 18	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	152
<i>E. gula</i>	GUL 19	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	153
<i>E. gula</i>	GUL 20	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	152
<i>E. gula</i>	GUL 21	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	167
<i>E. gula</i>	GUL 22	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	166
<i>E. gula</i>	GUL 23	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	152
<i>E. gula</i>	GUL 24	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	120
<i>E. gula</i>	GUL 25	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	123
<i>E. gula</i>	GUL 26	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	128
<i>E. gula</i>	GUL 27	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	135
<i>E. gula</i>	GUL 28	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	113
<i>E. gula</i>	GUL 29	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RAC 88-2	137

Tabla 1. Información sobre los peces estudiados

ESPECIE	CODIGO	COLECTADO EN	COORDENADAS	FECHA	VIAJE DE COLECTA	LONG. EST.
E. gula	GUL 30	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 22 88	RRC 88-2	115
E. gula	GUL 31	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	124
E. gula	GUL 32	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	116
E. gula	GUL 33	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	108
E. gula	GUL 34	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	107
E. gula	GUL 35	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	118
E. gula	GUL 36	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	124
E. gula	GUL 37	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	116
E. gula	GUL 38	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	118
E. gula	GUL 39	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	122
E. gula	GUL 40	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	124
E. gula	GUL 41	Progreso, Yuc	21°10'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	119
D. auratus	DIA 3	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	62
D. auratus	DIA 4	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	63
D. auratus	DIA 5	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	61
D. auratus	DIA 6	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	70
D. auratus	DIA 7	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	59
D. auratus	DIA 8	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	242
D. auratus	DIA 9	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	235
D. auratus	DIA 10	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	251
D. auratus	DIA 11	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	237
D. auratus	DIA 12	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	218
D. auratus	DIA 13	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ago 31 86	RRC 86-2	312
D. auratus	DIA 14	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 01 86	RRC 86-3	331
D. auratus	DIA 15	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 01 86	RRC 86-3	344
D. auratus	DIA 16	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 01 86	RRC 86-3	326
D. auratus	DIA 17	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 01 86	RRC 86-3	317
D. auratus	DIA 18	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 01 86	RRC 86-3	56
D. auratus	DIA 19	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	55
D. auratus	DIA 20	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	89
D. auratus	DIA 21	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	315.
D. auratus	DIA 22	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	312
D. auratus	DIA 23	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	237
D. auratus	DIA 24	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	314
D. auratus	DIA 25	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	322
D. auratus	DIA 26	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Sep 21 86	RRC 86-5	285
D. auratus	DIA 27	Cape Haze, Charlotte Harbor, FI	26°47'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	219

Tabla 1. Información... (continuación)

ESPECIE	CODIGO	COLECTADO EN	COORDENADAS	FECHA	VIAJE DE COLECTA	LONG. EST.
D. auratus	DIA 28	Cape Haze, Charlotte Harbor, Fl	26°47'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	225
D. auratus	DIA 29	Cape Haze, Charlotte Harbor, Fl	26°47'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	236
D. auratus	DIA 30	Cape Haze, Charlotte Harbor, Fl	26°47'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	323
D. auratus	DIA 31	Cape Haze, Charlotte Harbor, Fl	26°47'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	284
D. auratus	DIA 32	Cape Haze, Charlotte Harbor, Fl	26°47'N, 82°09'W	Ene 23 88	RRC 88-3	328
D. auratus	DIA 33	Cape Haze, Charlotte Harbor, Fl	26°47'N, 82°08'W	Ene 23 88	RRC 88-3	297
E. plumieri	PLU 5	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	220
E. plumieri	PLU 6	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	216
E. plumieri	PLU 7	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	224
E. plumieri	PLU 8	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	227
E. plumieri	PLU 9	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	211
E. plumieri	PLU 10	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	216
E. plumieri	PLU 11	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	214
E. plumieri	PLU 12	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	219
E. plumieri	PLU 13	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	185
E. plumieri	PLU 14	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	180
E. plumieri	PLU 15	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	178
E. plumieri	PLU 16	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	173
E. plumieri	PLU 17	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	175
E. plumieri	PLU 18	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	218
E. plumieri	PLU 19	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	204
E. plumieri	PLU 20	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	208
E. plumieri	PLU 21	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	212
E. plumieri	PLU 22	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Ene 23 88	RRC 88-3	178
E. plumieri	PLU 23	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	126
E. plumieri	PLU 24	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	120
E. plumieri	PLU 26	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	104
E. plumieri	PLU 27	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	73
E. plumieri	PLU 28	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	76
E. plumieri	PLU 29	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	71
E. plumieri	PLU 30	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	209
E. plumieri	PLU 31	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	201
E. plumieri	PLU 32	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	197
E. plumieri	PLU 33	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	215
E. plumieri	PLU 34	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	236
E. plumieri	PLU 35	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	224
E. plumieri	PLU 36	Progreso, Yuc	21°10'N, 89°30'W	Feb 01 88	RRC 88-4	214

Tabla 1. Información... (continuación)

b.3) Bando NOR

La tercera técnica fué para obtener bandas-NOR o Regiones del Organizador Nucleolar y siguió la rutina de Howell y Black (1980), en donde las preparaciones son tratadas mezclando en ellas dos gotas de AgNO₃ al 50 %, y una gota de revelador (compuesto de gelatina Knox al 2 % en agua desionizada, y un ml de ácido fórmico 91 %), este procedimiento se realizó a una temperatura de 70° C, fijando la preparación con tiosulfato de sodio al 5 %.

Todas las preparaciones fueron tratadas con Histo-Clear (National Diagnostics, Inc.) y montadas con Pro-Texx (Baxter Scientific Products). Los mejores campos mitóticos se fotografiaron en película Kodak Technical Pan 2415, con un fotomicroscopio automatizado Leitz Laborlux S, y finalmente las ampliaciones fueron impresas en papel Agfa-Brovira BEH-5. Tres o cuatro cariotipos por espécimen fueron preparados de acuerdo a la clasificación de Levan et al. (1964), que está basada en la proporción de los brazos de los cromosomas, usando como punto de referencia la posición del centrómero.

b.4) Alozimas

El análisis electroforético consistió en el estudio de diez sistemas alozímicos. Este se realizó en 31 ejemplares por especie. *Eucinostomus gula* y *Eugerres plumieri* fueron colectados en el área de Puerto Progreso, Yucatán, y *Diapterus auratus* en Port Charlotte, Florida.

El estudio electroforético de alozimas se realizó de acuerdo a los procedimientos de Aebersold et al. (1987) y Buth (1986 y 1984). Las muestras de tejidos, 1 cm³ de músculo, hígado o el ojo izquierdo fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml del buffer de extracción: Pipes [piperazine-N-N'-bis (2-ácido etanosulfónico)] 0.05 M, Tritón X-100 0.05 % y Fosfato-5-piridoxal 0.2 mM, el pH de este buffer se ajustó a 6.8 con NaOH 1.0 M.

Los geles se hicieron mezclando 100 ml de buffer caliente con 12 g de almidón de papa hidrolizado (Connaught Laboratories Limited), extrayendo el gas de la mezcla continuamente, para finalmente vertir el gel en el molde, cubrirlo con papel de celofán y dejarlo enfriar. Se emplearon tres buffers diferentes: AC, TBCL y TBE para la separación de las alozimas y sus composiciones se incluyen en el Apéndice. El gel se preparó cortando el origen a 3 cm del borde y paralelo a los lados más largos. Las muestras de tejido fueron centrifugadas durante 15 minutos/2000 X g en una centrifuga Sorvall RT6000, y los extractos se transfirieron al origen del gel por medio de papel filtro (Schleicher and Schuell Número 470) humedecido con el extracto. Las muestras se colocaron en el gel con una separación de 2 mm y a 5 mm de los bordes, incluyendo, para seguir la migración de las alozimas, una carrilera con colorante indicador (Apéndice). El buffer para la electroforesis se vertió en la cubeta de electroforesis, haciéndose la conexión entre el buffer y el gel con una tela esponjosa absorbente (Everywhere Wiper, Lola Products Corp.).

El gel fue conectado a una fuente de poder a 250 V para los buffers AC y TBCL y a 350 V para TBE. La corriente nunca excedió los 70 mA para evitar el calor excesivo. La corriente se aplicó durante 15 min, después de los cuales se desconectó la fuente de poder y se retiraron los papeles filtro usados para transferir los extractos. Cuidadosamente se reensambló el sistema y se procedió a correr la separación electroforética durante 4 h para el sistema con buffers AC y TBCL y 5 h para el TBE.

Una vez terminada la electroforesis los geles fueron cortados horizontalmente en 4-5 rebanadas. Cada una de estas fué teñida para identificar una de 10 alozimas diferentes. El reactivo para dicha tinción consistió de un buffer apropiado para la alozima, el substrato particular, cofactores y un colorante. Típicamente el colorante precipita o cambia de color en la presencia de uno de los productos de la acción alozímica. El

resultado fueron bandas visibles en el gel cuya interpretación siguió los criterios de Utter et al. (1987), quienes designan a los alelos de acuerdo a su movilidad electroforética relativa a un alelo común (*100), estimando las frecuencias alélicas por conteo directo de los alelos.

En el Apéndice se incluye la composición química de los reactivos usados para la identificación de cada una de las alozimas. Los sistemas alozímicos estudiados se enlistan en la Tabla 2.

Cuando la interpretación de los geles fue llevada a término la información obtenida fué analizada con el programa de computadora Biosys-1 Release 1.7 publicado por Swofford (1989). En este programa el grado de heterogeneidad genética es calculado usando el estadístico de Wright F_{st} (Wright, 1978), y el estadístico "Likelihood-ratio" (G) se usó para comparar las frecuencias alélicas (Sokal & Rohlf, 1981). Las distancias genéticas entre cada par de especies se calculó de acuerdo al método de Nei (1987), que corrige las desviaciones estadísticas cuando se analizan poblaciones pequeñas. Los dendogramas se construyeron con el método de grupos de pares no ponderados de las medias aritméticas (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic average clustering o UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973).

Tabla 2. Sistemas alozímicos estudiados

Sistema alozímico	Número*	Locus	Buffer	Tejido
Aspartato aminotransferasa	2.6.1.1	AAT	TBCL 8.0	M
Creatinina Kinasa	2.7.3.2	CK	EBT 8.6	M
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.8	G3PDH	TBCL 8.0	M,O
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.49	G6PDH	TBCL 8.0	M,H
Glucosa-6-fosfato isomerasa	5.3.1.9	GPI	EBT 8.6	M,H
L-Iditol deshidrogenasa	1.1.1.14	IDDH	TBCL 6.9	H
L-Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	LDH	EBT 8.6	M,O,H
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH	TBCL 6.9	M
Fosfoglucomutasa	5.4.2.2.	PGM	TBCL 8.0	M
Superoxidasa dismutasa	1.15.1.1	SOD	EBT 8.6	M,O

Número* = Número de la Comisión de enzimas, International Union of Biochemistry, 1984

M = músculo; O = ojo; H = hígado

b.5) ADN mitocondrial

El estudio del ADN mitocondrial se realizó en diez especímenes por especie. *Eucinostomus gula* y *Eugerres plumieri* provinieron de Puerto Progreso, Yucatán y *Diapterus auratus* de Port Charlotte, Florida.

El análisis del ADN mitocondrial con endonucleasas de restricción siguió los procedimientos establecidos por Chapman y Powers (1984) y Lansman *et al.* (1981). Estos consisten en homogenizar de 1-5 g de gónada en 3 volúmenes de MSB-Ca++ (Apéndice) en un homogenizador de tejidos motorizado con 3-4 pulsos del pistón. Se adicionó Na₂ EDTA (0.2 M con pH ajustado a 7.5 con NaOH) hasta obtener una concentración de 10 mM (0.35 ml en 7 ml de solución). Todas las operaciones subsecuentes se realizaron a -4° C. Los núcleos y otras estructuras resultantes de la homogenización fueron retiradas mediante centrifugación a 800 RPM/5 min, repitiéndose el procedimiento para disminuir la contaminación con cromosomas. Las mitocondrias se aislaron por centrifugación a 20,000 x g/20 min. El paquete de mitocondrias fué lavado resuspendiéndolo en 10 ml de MSB-EDTA (Apéndice) y centrifugándose nuevamente a 20,000 x g/20 min. Las mitocondrias fueron lisadas con 0.15 ml de Dodecil sulfato de sodio (SDS) 25 % resuspendiendo el paquete mitocondrial. Posteriormente se añadió CsCl sólido pulverizado (1.1 g por ml de lisado) para obtener el gradiente de separación por ultracentrifugación. Después se adicionó bromuro de etidio [(0.2 ml de una solución stock de 10 mg/ml en STE (Apéndice)] ajustando el índice de refracción entre 1.391-1.392 con CsCl o STE para obtener la concentración requerida. El lisado fue centrifugado durante 24 h a 0° C y 160,000 x g. Una vez lograda la separación de los gradientes, éstos fueron visualizados bajo luz UV (Figura 13); y el ADN mitocondrial fué separado del gradiente con una jeringuilla y aguja hipodérmica 18. Las endonucleasas de restricción utilizadas en este estudio fueron: Hae III, Hind III y Taq I. Las secuencias del mtDNA que estas endonucleasas reconocen se encuentran en el

apéndice. Las digestiones con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo utilizando 20 μ l del ADN mitocondrial obtenido, y se emplearon las condiciones de almacenamiento, dilución y digestión sugeridas por el fabricante de la endonucleasa (U.S. Biochemical Corporation, Cleveland Ohio). Esta información se incluye en el Apéndice.

Después de 4 h la digestión fue detenida adicionando 10 μ l de una solución hecha con 50 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol y 5% SDS. En este punto del proceso algunas muestras fueron almacenadas a 4 °C por 2 semanas.

Los fragmentos de ADN mitocondrial fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.1 % de acuerdo al método descrito por Maniatis et al. (1982). En la separación se incluyó simultáneamente un estandard de pesos moleculares. Este estandard fué el fago lambda digerido con la enzima Hind III. Una vez terminada la separación electroforética, el gel fué colocado en un recipiente con buffer de electroforesis y bromuro de etidio (1.5 μ g/ml), para incubarse durante 30 minutos. Finalmente el gel fué examinado por transiluminación con luz UV de onda corta y fotografiado con película Kodak pancromática T-Max 100, para hacer posteriormente la lectura de los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos. Los valores de la divergencia entre las secuencias, fueron calculados a partir de la comparación entre los fragmentos mediante las ecuaciones de Avise et al. (1979), y agrupados en "clusters" usando el método de grupos de pares no ponderados de las medias aritméticas (UPGMA) de Sneath y Sokal (1973), ambos incluidos en el programa de minicomputadora.

RESULTADOS

b.1) Citogenética convencional

El número cromosómico diploide modal resultó del análisis de un mínimo de 27 a un máximo de 40 metafases mitóticas por especimen. Estos números modales fueron obtenidos incluyendo metafases de los dos tejidos estudiados: epitelio branquial y riñón. Durante el estudio de estas metafases, se consideró que aquéllas con número cromosómico menor que la moda, resultaron de la técnica empleada, y que la diferencia no se debía a una mutación cromosómica.

El tamaño de los cromosomas fué pequeño y homogéneo teniendo el mayor elemento una longitud promedio de $1.5 \mu\text{m}$ en células de riñón y $2.5 \mu\text{m}$ en el epitelio branquial en *E. argenteus*. Se menciona este ejemplo como representativo de las otras especies de mojarra estudiadas, ya que no se encontraron diferencias en tamaño cromosómico entre las cuatro especies de mojarra. Generalmente los cromosomas obtenidos de células renales fueron más pequeños o condensados que los del epitelio branquial. Esta diferencia no fué cuantificada al asumirse que las células renales, son más sensibles al efecto tóxico del agente mitostático que las células epiteliales de las branquias. No se observaron diferencias en el número o tamaño de los cromosomas entre los cariotipos de machos y hembras de las especies estudiadas.

Las cuatro especies de mojarra presentaron un complemento cromosómico constituido por 48 elementos monorámicos que de acuerdo a la clasificación de Levan et al., (1964) fueron telocéntricos. La fórmula cromosómica mitótica modal, $2N = 48 = 48t$ fué idéntica para las cuatro especies. El Número Fundamental (NF) = 48.

El complemento cromosómico de los gerreidos forma una serie que disminuye gradualmente de tamaño, en el que el elemento de menor tamaño representa un 60% de la longitud total del mayor.

No fué posible distinguir entre las cuatro especies de mojarras empleando como criterios el tamaño de los cromosomas o el cariotipo estandard.

b.2) Bando G (Giemsa)

Los patrones de bandas-G (Giemsa), mediante digestión enzimática de los cromosomas con tripsina, no fueron observados en ninguna de las especies estudiadas. Los cariotipos obtenidos con esta técnica de bando fueron similares a los cariotipos estandard. Es necesario señalar que se utilizó una combinación de regímenes de digestión enzimática diferentes, en ellos se cambiaron la concentración de tripsina, ensayándose digestiones a diferentes temperaturas, y variando los tiempos de duración de la digestión

b.3) Bando NOR

Los cariotipos-NOR de *E. argenteus* y *E. harengulus* se caracterizaron por tener regiones del organizador nucleolar en yuxtaposición con la región centromérica en los cromosomas homólogos del primer par. Los 46 cromosomas restantes del complemento presentaron una ligera tinción del centrómero, no existiendo en ningún elemento del cariotipo bloques terminales o intercalares de heterocromatina. *E. gula* y *E. plumieri*, exhibieron NORs situados adyacentes al centrómero en los elementos del cuarto par cromosómico. Los 46 cromosomas restantes adquirieron también una ligera tinción de los centrómeros, y ningún cromosoma tuvo bloques heterocromáticos intercalares o terminales. Las mojarras del género *Eucinostomus* tuvieron NORs de tamaños muy similares, mientras que *E. plumieri* mostró NORs más grandes. Estos fueron 10 - 20% más grandes que los del género *Eucinostomus*. Las diferencias que se observaron en los NORs comprendieron: variabilidad interespecífica e intraespecífica entre cromosomas homólogos.

ESPECIE	CODIGO	LONGITUD ESTANDARD (mm)	SEXO	NUMERO DE MITOSIS ESTUDIADAS				FRECUENCIA DE NUMEROS CROMOSOMICOS			NUMERO CROMOSOMICO (MODA)	NUMERO FUNDAMENTAL	FORMULA CROMOSOMICA
				EPITELIO RIÑON TOTAL				45	46	47			
E. argenteus	EUC 2	123	Masculino	17	12	29	0	1	0	28	48	48	48t
E. argenteus	EUC 3	127	Femenino	12	15	27	0	1	1	25	48	48	48t
E. argenteus	EUC 6	91	Femenino	15	15	30	0	2	0	28	48	48	48t
E. argenteus	EUC 8	81	Femenino	15	15	30	0	0	1	29	48	48	48t
E. argenteus	EUC 9	84	Femenino	20	15	35	0	0	3	32	48	48	48t
E. argenteus	EUC 12	61	Masculino	15	15	30	0	3	1	26	48	48	48t
E. harengulus	EUC 4	65	Femenino	15	20	35	0	1	2	32	48	48	48t
E. harengulus	EUC 5	82	Masculino	15	15	30	0	1	0	29	48	48	48t
E. harengulus	EUC 10	81	Masculino	17	15	32	0	0	1	31	48	48	48t
E. harengulus	EUC 13	74	Femenino	16	20	36	1	0	2	33	48	48	48t
E. gula	EUC 7	76	Femenino	20	18	38	0	2	3	33	48	48	48t
E. gula	EUC 11	68	Masculino	15	20	35	0	0	1	34	48	48	48t
E. gula	MOJ 15	87	Femenino	15	15	30	0	0	3	27	48	48	48t
E. gula	MOJ 16	95	Masculino	14	15	29	0	0	0	29	48	48	48t
E. plumieri	EUG 1	222	Femenino	20	20	40	0	0	1	39	48	48	48t
E. plumieri	EUG 2	206	Masculino	20	20	40	0	0	0	40	48	48	48t
E. plumieri	EUG 3	182	Masculino	15	15	30	0	1	0	29	48	48	48t
E. plumieri	EUG 4	186	Femenino	15	15	30	0	1	0	29	48	48	48t

Tabla 3. Resultados del análisis citogenético



Figura 2. Cariotipo de E. argenteus

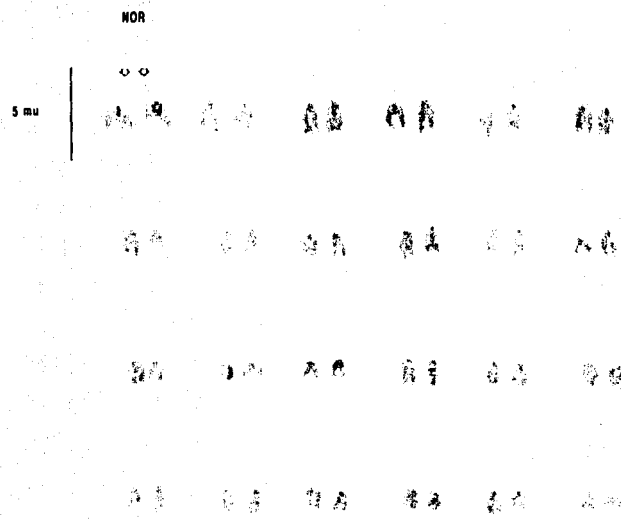


Figura 3. Cariotipo-NOR de E. argenteus

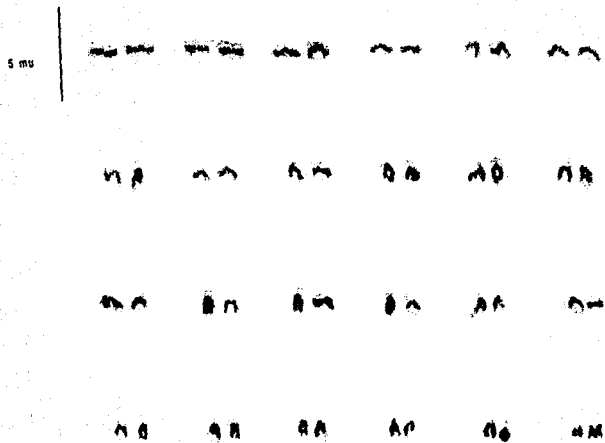


Figura 4. Cariotipo de *E. guia*

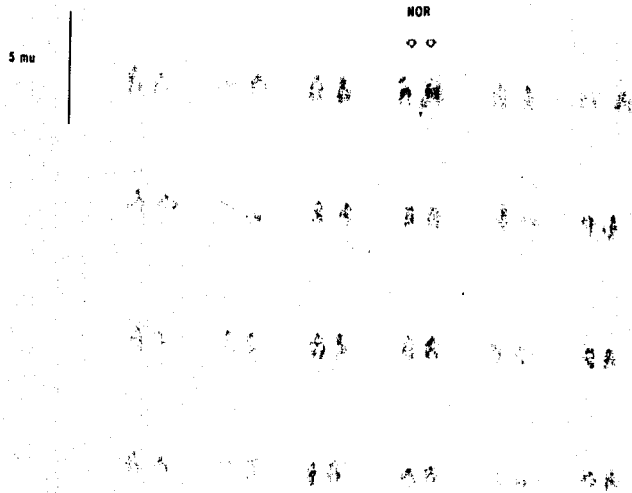


Figura 5. Cariotipo-NOR de *E. gulf*



Figura 6. Cariotipo de *E. harengulus*

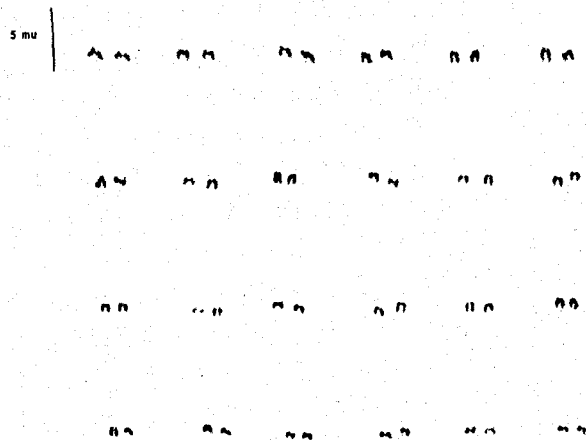


Figura 8. Cariotipo de *E. plumieri*

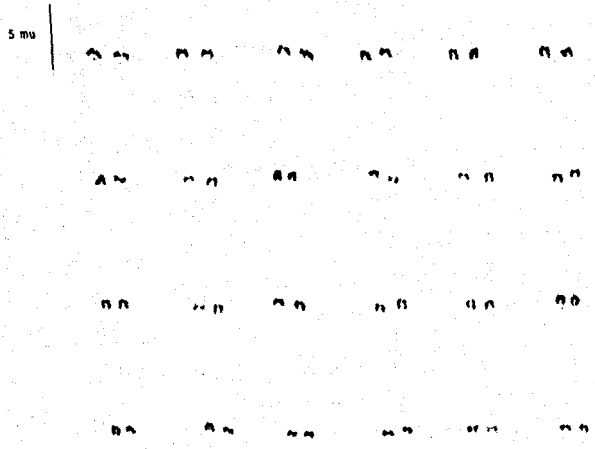


Figura 8. Cariotipo de *E. plumieri*

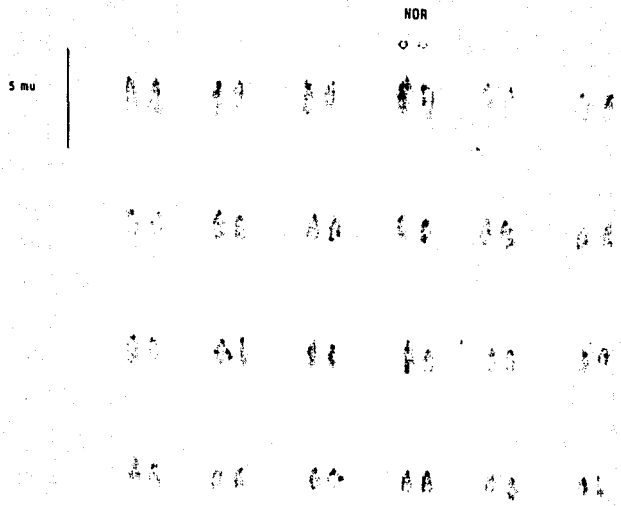


Figura 9. Cariotipo-NOR de *E. plumieri*

En la Tabla 3 se resumen parte de los resultados del análisis citogenético, y en las Figuras 2 al 9, se presentan los cariotipos standard y NORs de las especies estudiadas.

b.4) Alosimas

El análisis electroforético de los sistemas alozímicos se realizó en 31 ejemplares por especie. *Eucinostomus gula* y *Eugerres plumieri* fueron colectadas en el área de Progreso, Yucatán, y *Diapterus auratus* en Port Charlotte, Florida. En los 10 sistemas alozímicos analizados se detectaron 32 alelos, determinados genéticamente por 18 loci (Tabla 4). De los 18 loci, 11 fueron monomórficos, 7 polimórficos y 3 pudieran considerarse sistemas divergentes. Estos sistemas divergentes pueden tener carácter diagnóstico para la identificación taxonómica.

Los loci codificadores de las enzimas: AAT, G6PDH-b, GPI_{músculo}, GPI_{hígado}, LDH-b, LDH-c y MDH_{hígado} fueron polimórficos (politépicos) en los taxa examinados.

La enzima Aspartato amino transferasa (AAT) tuvo actividad intensa en unas muestras, pero algunos electroferogramas (zimogramas) presentaron deficiencias de tinción. El fenotipo heterozigótico mostró claramente tres bandas por lo que se trató de una enzima dimérica, de la que se identificaron tentativamente cuatro alelos. No obstante, por las dificultades en la tinción, esta enzima no fué incluida en el análisis.

Las bandas de tinción específica de la creatinina kinasa (CK), mostraron su naturaleza dimérica, y su carácter monomórfico en las tres especies.

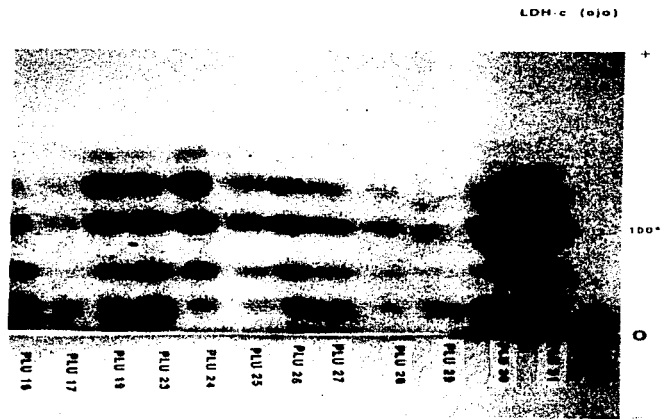


Figura 10. Electroferograma de LDH

G3PDH (mU/CEG70)

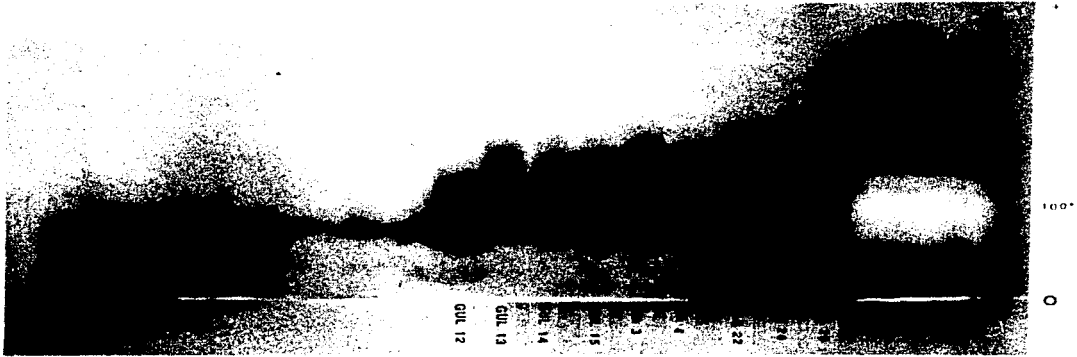


Figura 11. Electroferograma de G3PDH

La enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de músculo e hígado fué dimérica y monomórfica.

La Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH-a) en músculo fué dimérica y monomórfica, mientras que la forma b identificada en hígado fué polimórfica con dos alelos.

La enzima Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI-1) presentó un patrón de proteína dimérica con cinco alelos en músculo y tres alelos en hígado. La forma de músculo tuvo caracter divergente entre los tres géneros de mojarra analizadas.

La L-Iditol deshidrogenasa (IDDH)-a fué una enzima tetramérica y monomórfica en las tres especies de gerreidos estudiados.

La Lactato deshidrogenasa (LDH), enzima tetramérica, estuvo compuesta por dos tipos de cadenas polipeptídicas producto de dos genes estructurales, LDH-a de músculo y LDH-b de hígado. Un tercer producto LDH-c fué identificado en el ojo de los gerreidos. La LDH-a fué monomórfica, mientras que las formas LDH-b y LDH-c presentaron polimorfismo con dos y tres alelos respectivamente, teniendo esta última caracter divergente.

La Malato deshidrogenasa (MDH), enzima dimérica monomórfica en músculo, mostróse polimórfica con dos alelos y caracter divergente en hígado.

La Fosfoglucomutasa-a (PGM-a) y PGM-b fueron enzimas monomórficas en músculo.

La enzima Superoxidasa dismutasa (SOD) fué dimérica y tuvo caracter monomórfico en músculo e hígado de las mojarra.

La Figura 10, presenta un electroferograma de LDH-c, y la Figura 11, presenta un electroferograma de G3PDH.

Los valores de las distancias genéticas se calcularon a partir de los productos alélicos de los 17 loci analizadas en las

tres especies. Los valores de las distancias e identidades genéticas calculados con Biosys-I Release 1.7 y se presentan en la tabla 5.

Eugerres plumieri y *Diapterus auratus* compartieron entre sí más alelos que ninguna de las otras combinaciones de las especies estudiadas. La distancia genética fué menor entre *Eugerres plumieri* y *Diapterus auratus* que entre *Eucinostomus gula* y *Diapterus auratus*, o que entre *Eugerres plumieri* y *Eucinostomus gula*.

El dendograma de similitud genética obtenido con el método UPGMA del programa Biosys-1 se presenta en la figura 12.

Los valores de heterozigocidad, calculados con el mismo programa se muestran en la tabla 6.

b.5) ADN mitocondrial

El análisis del ADN mitocondrial se realizó en diez especímenes por especie. *Eucinostomus gula* y *Eugerres plumieri* provinieron de Puerto Progreso, Yucatán y *Diapterus auratus* de Port Charlotte, Florida. Se ensayaron tres endonucleasas de restricción en el ADN mitocondrial total de cada uno de los gerreidos. La Figura 13, muestra la separación de ADN mitocondrial total obtenida en una columna de cloruro de cesio, teñida con bromuro de etidio, e iluminada con luz ultravioleta de 365 μm de lambda. Las endonucleasas de restricción empleadas: Hae III, Hind III y Taq I, cortaron el ADN mitocondrial total en fragmentos en número de 3 a 6, cada uno de ellos con diferente peso molecular. La Figura 14, presenta una separación electroforética de los fragmentos de ADN mitocondrial en gel de agarosa 1.1 % después de la digestión enzimática.

Tabla 4. Frecuencias alélicas en los sistemas alozímicos de las tres especies de gerreidos estudiados.

Alozima		Alelo	<i>E. gula</i>	<i>D. auratus</i>	<i>E. plumieri</i>
AAT	M	*100	0.975	0.000	0.000
		125	0.025	0.000	0.045
		130	0.000	0.930	0.955
		140	0.000	0.070	0.000
CK-a	M	*100	1.000	1.000	1.000
G3PDH	M	*100	1.000	1.000	1.000
G3PDH	H	*100	1.000	1.000	1.000
G6PDH-a	M	*100	1.000	1.000	1.000
G6PDH-b	H	*100	0.950	1.000	1.000
		125	0.050	0.000	0.000
		*100	1.000	0.000	0.000
GPI-1	M	*100	1.000	0.000	0.000
		125	0.000	0.825	0.000
		80	0.000	0.000	0.043
		75	0.000	0.175	0.000
		70	0.000	0.000	0.957
GPI-2	H	*100	0.000	0.014	1.000
		130	0.862	0.986	0.000
		95	0.138	0.000	0.000
IDDH-a	H	*100	1.000	1.000	1.000
LDH-a	M	*100	1.000	1.000	1.000
LDH-b	H	*100	1.000	1.000	0.980
		90	0.000	0.000	0.020
LDH-c	O	*100	1.000	0.896	0.770
		85	0.000	0.104	0.000
		70	0.000	0.000	0.230
MDH-a	M	*100	0.015	1.000	1.000
		115	0.985	0.000	0.000
MDH-b	M	*100	1.000	1.000	1.000
PGM-a	M	*100	1.000	1.000	1.000
PGM-b	M	*100	1.000	1.000	1.000
SOD	M	*100	1.000	1.000	1.000
SOD	O	*100	1.000	1.000	1.000

M = músculo, H = hígado, O = ojo

Los pesos moleculares promedio del ADN mitocondrial total fueron: *Eucinostomus gula* 16,970 ± 60 pares de bases (pb), *Eugerres plumieri* 16,980 ± 60 pb y *Diapterus auratus* 16,960 ± 60 pb. La Tabla 7, resume los resultados de la digestión del ADN mitocondrial con las endonucleasas de restricción. En ella se presentan los diferentes fragmentos obtenidos, y los pesos moleculares totales, expresándose estos valores como pesos moleculares en pares de kilobases (Kb).

El número de fragmentos de restricción, junto con el número respectivo de sitios de restricción compartidos entre cada pareja de gerreidos, es presentado en la Tabla 8.

Finalmente se presenta el dendograma de divergencia entre las secuencias del mtDNA. Este fué construido por el método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) a partir de los pesos moleculares de los fragmentos de restricción.

Tabla 5. Matriz de Distancias genéticas/Identities genéticas

Arriba de la diagonal: Nei (1978) unbiased distancia genética

Debajo de la diagonal: Nei (1978) unbiased identidad genética

Población	1	2	3
1 <i>Eucinostomus gula</i>	****	.235	.301
2 <i>Diapterus auratus</i>	.791	****	.169
3 <i>Eugerres plumieri</i>	.740	.845	****

Tabla 6. Valores de heterozigocidad en gerreidos

	n	Número de Alelos/Locus	% de Loci Polimórficos	Observado	Esperado Hardy-Weinberg
<i>E. gula</i>	31	1.4 (0.1)	16.7	0.029 (0.012)	0.034 (0.013)
<i>D. auratus</i>	31	1.2 (0.1)	11.1	0.014 (0.009)	0.023 (0.013)
<i>E. plumieri</i>	31	1.2 (0.1)	11.1	0.007 (0.004)	0.024 (0.012)

(Error estandard)

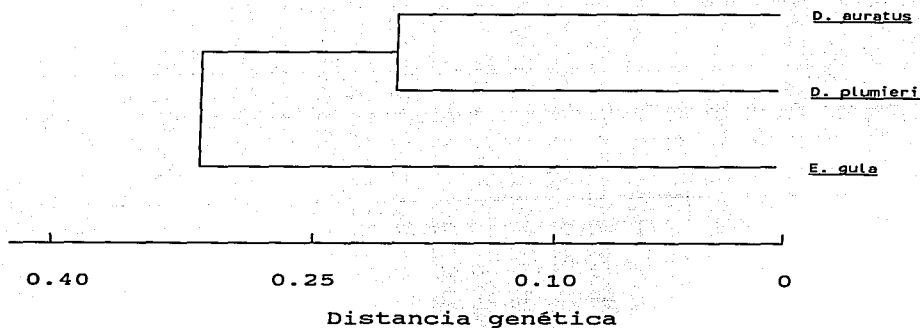


Figura 12. Dendrograma de similitud genética

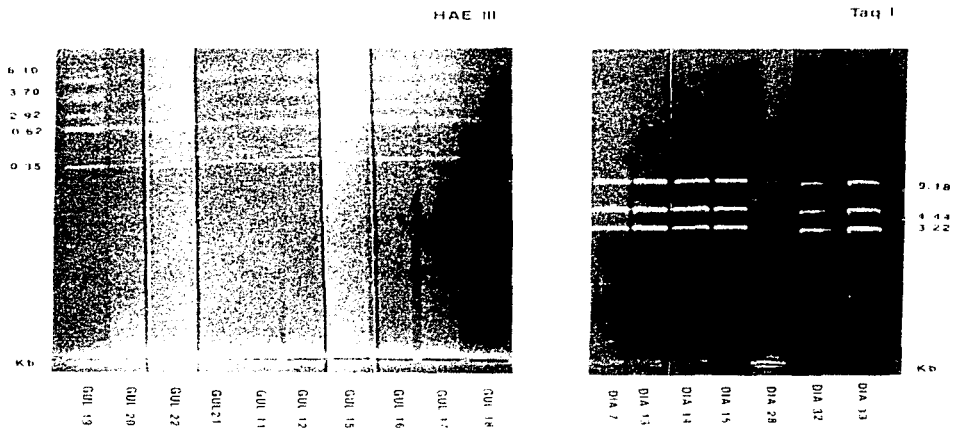


Figura 14 Patrón electroforetico de los fragmentos del mtDNA.

Tabla 7. Tamaño de los fragmentos de mtDNA producidos por la digestión con tres endonucleasas de restricción

<i>E. gula</i>			<i>E. plumieri</i>			<i>D. auratus</i>		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
6.10	5.66	12.40	6.60	9.10	12.40	5.66	9.10	9.18
3.70	4.94	4.44	4.70	4.94	3.22	4.70	3.36	4.44
3.10	3.30	1.01	3.40	2.82	1.01	3.70	2.30	3.22
2.92	2.38		2.20		0.36	2.92	1.66	
0.62					0.21		0.65	
0.35								
16.79	16.28	17.85	16.90	16.86	17.20	16.98	17.07	16.84
PM = 16.97			PM = 16.98			PM = 16.96		

Endonucleasa 1 = Hae III, 2 = Hind III, 3 = Taq I

Pesos moleculares = PM, en Kb

Tabla 8. Número total de fragmentos de restricción del mtDNA, y número de fragmentos en común entre cada pareja de gerreidos

Enzima	Número de fragmentos			Fragmentos en común		
	g	p	a	g/p	g/a	p/a
Hae III	6	4	4	0	2	1
Hind III	4	3	5	1	0	1
Taq I	3	5	3	2	1	1
Total	13	12	12	3	3	3

g = *Eucinostomus gula*
 p = *Eugerres plumieri*
 a = *Diapterus auratus*

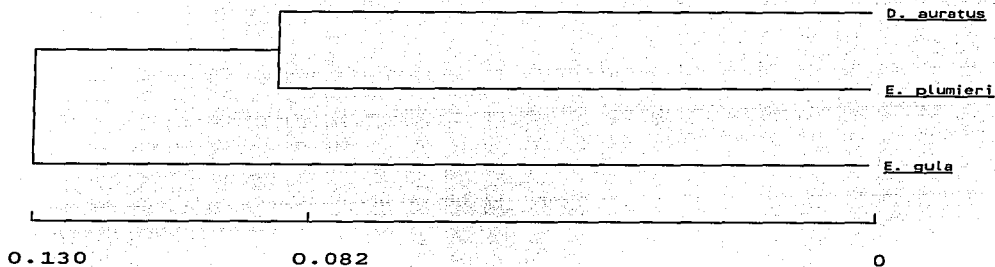


Figura 15. Dendrograma de la divergencia entre las secuencias del mtDNA de gerreidos

DISCUSION

La evolución biológica es esencialmente un proceso de descendencia genealógica o filogenética, y resulta paradójico que al no poder observar las relaciones filogenéticas debamos de inferirlas a partir de caracteres biológicos mensurables.

Las huellas dejadas por el proceso evolutivo en estos caracteres, particularmente en aquellos heredables, permiten que se considere al ADN como un manuscrito de la historia evolutiva. En el ADN de cada ser vivo está escrita su evolución, y por ello es que cabalmente sólo el estudio de los caracteres transmitidos genéticamente puede ofrecer información filogenética (Nei, 1987). Por otro lado, el uso de caracteres mendelianos moleculares permite superar uno de los escollos de la sistemática tradicional, que es el peligro de confundir entre el componente de la similitud biológica debido a descendencia de un ancestro común y el componente debido a la convergencia (Avice et al., 1990, 1986; Nei, 1987).

La información evolutiva en el material genético puede suponerse desordenada, fragmentada, encubierta y quizás con porciones perdidas en el transcurso del proceso evolutivo. El presente estudio sobre los gerreidos ha tratado de revelar, ordenar e interpretar los datos históricos mediante el uso de caracteres heredables tales como los cromosomas, las alozimas y el ADN mitocondrial (Phillips e Ihssen, 1986; Avice y Saunders, 1984; Ayala, 1978). Estos tres enfoques fueron independientes y complementarios.

a) Citogenética

El número cromosómico diploide modal, $2n = 48$, observado en: *Eucinostomus argenteus*, *E. gula*, *E. harengulus* y *Eugerres plumieri*, era de cierta manera esperado, por la posición filogenética que esta familia ictica ocupa en los sistemas de clasificación aceptados actualmente (Nelson, 1984; Gosline, 1971; Greenwood et al., 1966). Las mojarras se sitúan dentro del grupo de los teleosteos avanzados. Dentro de este grupo el 67 % de las especies estudiadas citogenéticamente presentaron el número cromosómico diploide modal de $2n = 48$.

Los cariotipos de las cuatro especies, estuvieron compuestos por 24 pares de cromosomas telocéntricos, siendo su fórmula cromosómica común $2n = 48t$, y los números fundamentales $NF = 48$. La concordancia en estas características citogenéticas sugiere que los gerreidos forman un grupo muy homogéneo, y que la identidad de sus características de número y forma cromosómicas son reflejo de una cercana relación filogenética. Las longitudes de los cromosomas decrecieron ligeramente del par 1 al 24. El cariotipo de los gerreidos estuvo compuesto por cromosomas de la misma clase, telocéntricos, formando una serie continua de tamaños decrecientes.

El par 24 representó un 60 % de la longitud del primer par cromosómico. En ausencia de marcadores cromosómicos idóneos el arreglo de los cariotipos se realizó en base al tamaño de los elementos cromosómicos, y por ello la numeración de estos cromosomas fué arbitraria.

Debido al limitado número de organismos estudiados, el polimorfismo cromosómico pudiera haber sido subestimado. En estudios más extensos realizados en una sola especie, como los llevados a cabo en *Gobius paganellus* (Gobiidae), se encontraron números cromosómicos diferentes, en diferentes poblaciones de la misma especie, y se especuló que la selección natural, favorecía números cromosómicos reducidos en el Mediterráneo y números

mayores en el Atlántico. (Vitturi et al., 1984; Thode et al., 1983 y Cataudella et al., 1973). Sin embargo, el número de organismos estudiados en esta tesis se considera suficiente para la obtención de los objetivos planteados debido a la estabilidad cariotípica de la Clase Pisces. Este número es comparable al de otros estudios similares (Sola et al., 1993; Klinkhardt, 1991a; Rab et al., 1991; Uribe Alcocer, 1988; Cano et al., 1982).

Ohno (1970) y Ohno y Atkins (1966) en sus estudios comprehensivos de evaluación de los números cromosómicos de los vertebrados, concluyeron que 48 cromosomas acrocéntricos (= telocéntricos) y un contenido nuclear de 1.3 μ g (picogramos) representaban el estadio ancestral en la clase de los peces. El valor del contenido nuclear de los gerreidos no fué determinado, por lo que no fué posible ubicar el desarrollo del grupo Gerreidae de acuerdo a las observaciones de Ohno y Atkins.

Por otra parte, las diferencias observadas en el grado de contracción de los cromosomas, se interpretaron como resultado de la técnica empleada. Debido al alto número de variables que interactúan cuando se realizan estudios citogenéticos *in vivo*, y a que estas variables son las determinantes del grado de contracción, se aceptó el supuesto de que no existe correlación entre la longitud total del genoma, o grado de contracción, y el contenido nuclear de ADN. Sin embargo, se señala que en algunos blénidos del Mediterráneo esta suposición no fué válida, al demostrarse que la variabilidad en longitud, era causada por pequeñas duplicaciones y deleciones cromosómicas (Cano et al., 1982).

En la clase Pisces, al recorrer evolutivamente de los órdenes ancestrales a los más recientes, se ha detectado un ligero decremento en el tiempo de generación, y un aumento en el número de generaciones por unidad de tiempo (Arkhipchuk, 1988). Al incluir datos cariológicos en estas comparaciones, de manera contraria a lo que se esperaría teóricamente -es decir, que peces con tiempo de generación menor, presentaran un aumento en la

evolución cariotípica- se encontró que ésta se incrementa al aumentar el tiempo de generación. Arkhipchuk y Berdyshev (1988) más tarde, sugirieron que la tasa evolutiva, estimada por el número cromosómico en función del tiempo que ese taxón ha existido, no tiene correlación con el tiempo de generación, mientras que la tasa de evolución, evaluada a través de la morfología cromosómica, presentó en sus análisis una correlación ligeramente negativa. Al considerar las diferencias entre tiempo de generación y número de generaciones por unidad de tiempo entre los géneros *Eucinostomus* y *Eugerres* (Albaret et al., 1988; Baez Hidalgo et al., 1982; Aguirre León et al., 1982; Rubio, 1975 y Angel, 1975), conjuntamente con la homogeneidad en números y morfología cromosómicas, se puede inferir que su diferenciación ocurrió recientemente.

La diferenciación morfológica entre las mojarras estudiadas, no correspondió con la diferenciación a nivel cromosómico. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Cataudella et al., (1973), quienes en los lábridos: *Symphodus melops* y *Symphodus roissali*, especies casi indistinguibles morfológicamente, observaron números cromosómico y fundamental diferentes. Un estudio posterior de las mismas especies (López et al., 1989), reiteró las diferencias en número cromosómico, e indicó números fundamentales diferentes.

En este estudio no se detectaron diferencias entre los cariotipos de machos y hembras, por lo que se descartó la presencia de cromosomas heteromórficos. Si los cromosomas sexuales existen, éstos deben de encontrarse en los estadios tempranos de diferenciación. Las diferencias entre estos cromosomas sexuales, pudieran detectarse mediante técnicas más avanzadas, como la hibridización con la sonda molecular del gene codificador del antígeno H-Y, o con la sonda molecular del gene codificador de la proteína ZFY. Los estudios de hibridización en anguillidos, situaron al locus responsable de la producción del antígeno H-Y, en la única banda C positiva de la eucromatina del

cromosoma W, el resto del cual resultó negativo al bandeado C. (Park y Grimm, 1981). Aquí debe resaltarse, que los cromosomas sexuales en los anguilidos están altamente diferenciados, de forma tal, que son comparables a los cromosomas de aves, algunos ofidios y anfibios (Lanfear y Holland, 1991; Birstein, 1982; Park y Grimm, 1981).

En la clase Pisces, la diferenciación de los cromosomas sexuales probablemente se inició con cromosomas homomórficos, en los que la determinación del sexo era a nivel génico. Posiblemente la diferenciación incipiente de cromosomas heteromórficos sexuales, resultó de la inhibición del entrecruzamiento entre los pares homólogos originales, originando el aislamiento de los elementos o loci determinantes del sexo (Ohno, 1974).

La comparación de los complementos cromosómicos de los peces con los de otros vertebrados, generalmente muestra que los primeros son primitivos, homomórficos y con tendencias de diferenciación morfológica poco evidentes. Sin embargo, en algunas especies de salmónidos los cromosomas sexuales se han identificado claramente (Thorgaard, 1978 y 1977). En otros casos, ha sido posible postular hipótesis sobre los mecanismos de su origen, como en el congrio *Conger myriaster*, en donde Ojima y Ueda (1982) reportaron una inversión pericéntrica como la causa probable de su diferenciación. No obstante, la identificación de los cromosomas sexuales generalmente ha sido muy difícil, como por ejemplo en el género *Eigenmania* (Gymnotiformes), en que un cromosoma sexual se fusionó con un autosoma (De Almeida-Toledo et al., 1984). Igualmente, existen otros sistemas complejos, muy similares a los encontrados en los gymnotiformes (Murofushi et al., 1980; Thorgaard, 1978 y Uyeno y Miller, 1971).

Se ha sugerido como primer paso en la diferenciación cromosómica sexual, la heterocromatización o desarrollo de secuencias altamente repetidas. Por ejemplo en *Poecilia reticulata* (guppy), *P. sphenops*, *P. velifera*, *Xiphophorus*

helleri, *X. maculatus* mediante el uso del oligonucleotido (GATA)_n y la sonda molecular (GACA)_m, se demostró que ciertas secuencias repetidas en tandem estuvieron asociados con la heterocromatina constitutiva de los cromosomas sexuales (Nanda et al., 1992). La aparente heterozigosidad del macho, estuvo correlacionada con la sonda (GACA)₄ en *P. reticulata*. Sin embargo, el oligonucleótido (GATA)₄ identificó a ciertos guppies debido a un polimorfismo en el cromosoma Y. Contrastando con estos resultados, las condiciones heterogaméticas de los machos de *Xiphophorus* no pudieron verificarse con sondas moleculares. En este caso, únicamente individuos de poblaciones particulares, produjeron patrones específicos para cada sexo con (GATA)₄. Por lo que se postuló que existen varios estadios en la diferenciación cromosómica sexual, y que ésta es específica para la especie o la población particular de que se trate. Las secuencias ZFY estuvieron presentes, pero no brindaron información en *Xiphophorus* (S.R. Robertson y M. Scharl, datos no publicados) y en el guppy (I. Nanda, datos no publicados).

La heterocromatización de los cromosomas sexuales primitivos, precedió al cambio morfológico en los vertebrados menores, como se ha observado en lagartijas y ofidios, en los que se han detectado diferencias en la posición de las Regiones del Organizador Nucleolar en cromosomas homomórficos. Finalmente en los vertebrados superiores los cromosomas sexuales están altamente diferenciados, e invariablemente los machos presentan un cromosoma Y rico en heterocromatina constitutiva. En los peces cyprinodontes, se han observado una gama de diferencias graduales entre homomorfismo y heteromorfismo. En *Fundulus*, Cyprinodontidae, se observó un cambio gradual en la acumulación de heterocromatina, y se ha postulado que se requiere una secuencia de eventos tales como la pérdida de brazos cromosómicos y la heterocromatización, con desarrollo de compensación de dosis para explicar la diferenciación de los cromosomas sexuales (Kornfield, 1981). Contrastan con esta diferenciación de los cromosomas sexuales, los complejos sistemas sociales de los peces

hermafroditas protóginos, en los que en ocasiones existen diferencias morfológicas notables, entre los machos primarios, los machos secundarios y las hembras de la misma especie. Estas diferencias morfológicas, de coloración y de comportamiento en el lábrido *Coris julis* eran determinadas por variación en el número cromosómico (Duchac et al., 1982). Sin embargo, este mecanismo no pudo confirmarse en otros sistemas sociales de hermafroditas protóginos de las familias Labridae y Serranidae (Vitturi et al., 1986b; Ruiz Carús, 1983; Cano et al., 1982), como tampoco se encontraron en hermafroditas protándricos, tales como el robalo común, *Centropomus undecimalis*, Centropomidae (Ruiz Carús, 1992 y 1993). Estos estudios comparativos de los cromosomas sexuales incipientes de los peces, presentan potencialmente por su diversidad, la información que podrá llenar el vacío de conocimientos existente sobre esta etapa de la evolución de los vertebrados, y particularmente de los peces.

Dentro de este contexto evolutivo, las características de número y morfología cromosómicas sitúan a los gerreidos muy cerca del estadio ancestral sugerido por Ohno (1970) y Ohno y Atkins (1966). Este estadio cromosómico ancestral se presenta en los teleósteos más generalizados, quienes durante su ciclo biológico colonizan habitats diferentes. Los gerreidos viven principalmente en ambientes estuarinos, con grandes fluctuaciones físico-químicas, y desovan en aguas marinas costeras. Más tarde, sus larvas planctónicas son acarreadas por las corrientes, y se establecen en el ambiente estuarino, en donde encuentran protección y alimento hasta alcanzar su etapa reproductiva (Cyrus y Blaber, 1984, 1983; Lasserre y Tofart, 1975). Debido a la diversidad de los habitats en que las mojarras se desenvuelven, puede considerarse que el estadio cromosómico ancestral, corresponde a un genoma generalizado. Este genoma les confiere la plasticidad requerida, para subsistir en habitats acuáticos muy diversos.

Las bandas G no fueron identificadas en ninguna de las especies de mojarras examinadas. Resulta evidente que dentro del contexto evolutivo, es necesario el bandeo diferencial para establecer la variación interespecífica, y determinar las relaciones filogenéticas entre los grupos estudiados. Desafortunadamente los métodos empleados no generaron los resultados esperados. Pudiera argumentarse que esto se debió a la técnica utilizada o a limitaciones físicas para discernir las bandas en cromosomas telocéntricos pequeños. De hecho las observaciones de bandas cromosómicas G en peces, se han realizado únicamente en los cromosomas metacéntricos o submetacéntricos de mayor tamaño de los complementos cromosómicos (Gold, 1990, Sola et al., 1984, Blaxhall, 1983). Sin embargo, esta ausencia de bandas G, puede interpretarse a la luz de los propuestos de Birstein (1982), quien consideró que los cromosomas de peces son similares estructuralmente a los cromosomas de anfibios porque responden de manera similar a las técnicas de tinción diferencial. Aunada a esta característica, los datos sobre perfiles de desnaturalización térmica del ADN de peces (Gold y Karel, 1988; Karel y Gold, 1987), señalaron valores bajos, hasta 36 %, en la composición de bases G-C, indicando que además existe una distribución uniforme de G-C en los cromosomas. Algunas de las especies analizadas por Gold y Karel (1988), también han sido estudiadas cromosómicamente, y en ellas la ausencia de bandas G se correlaciona con la uniformidad en la distribución de G-C. (Medrano, et al., 1988; Ruiz-Carús, 1983). Análogamente podemos pensar que en los gerreidos la ausencia de las bandas G indican una distribución uniforme de G-C, y que su heterocromatina tiene bajo contenido de estas bases.

Hudson et al. (1980) documentaron en 10% de 64 especies, la existencia de diferencias en la uniformidad de la distribución de G-C. Pero la evidencia más convincente, fué presentada en los estudios de 122 especies de peces, donde se observaron diferencias en la longitud de las secuencias intergénicas no codificantes. Estas secuencias tenían un contenido bajo en G-C,

mientras que en la heterocromatina, las repeticiones en tandem de los satélites crípticos, fueron ricas en G-C (Bernardi y Bernardi, 1990a y 1990b).

La homogeneidad en números y morfología cromosómicos, aunada a la carencia de bandas G, sugieren que los cambios cariotípicos principalmente del tipo Robertsoniano parecen no haber jugado un papel preponderante en la especiación de los gerreidos, aunque existe la posibilidad de que se hayan dado reordenamientos dentro del mismo cromosoma. Lo que se podrá analizar cuando existan metodologías de bandeado cromosómico eficaces en los cromosomas de los peces.

Las constricciones secundarias en los cromosomas han sido llamadas Regiones del Organizador Nucleolar o NORs, debido a su asociación con los nucléolos. La afinidad de las NOR's por la plata, señala las regiones en donde hubo actividad transcritiva en la mitosis precedente (Takai y Ojima, 1986).

Las mojaras del género *Eucinostomus*, *E. argenteus* y *E. harengulus* presentaron un par de NORs localizadas en el primer par cromosómico, mientras que en *E. gula* al igual que en *Eugerres plumieri* se encontraron en el cuarto par del complemento. El heteromorfismo interespecífico, se debió a diferencias en la posición y tamaño de las NORs. La diferencia de tamaño se detectó entre *Eucinostomus* y *Eugerres*, pero no se observó al comparar las tres especies de *Eucinostomus*: *E. argenteus*, *E. harengulus* y *E. gula*. Dentro del género *Eucinostomus* hubo diferencias en la posición de las NOR's. Estas diferencias de posición son similares a las encontradas en otros estudios de peces (Klinkhardt, 1991a; Martínez, et al., 1989; Mayr et al., 1987; Gold et al., 1988b; Gold y Amemiya, 1986; Phillips et al., 1986b). Las diferencias en tamaño de NORs en cromosomas homólogos de la misma especie, son muy parecidas a las documentadas en otros grupos de peces (Rab et al., 1991; Moreira Fihlo et al., 1984; Foresti et al., 1981; Ojima y Yamano, 1980; Kornfield, 1981; Kornfield et al., 1979).

Se ha considerado que las bandas NOR, son regiones heterocromáticas, ricas en guanosina-citosina, y que el polimorfismo observado se debe a diferencias en la actividad transcripcional de las regiones homólogas (Amemiya y Gold, 1986, Sahota et al., 1986). Comparaciones entre la variabilidad mostrada por la tinción de plata y la tinción convencional de giemsa, con la homología del tamaño mostrada por estas regiones heterocromáticas mediante bandeado C, han sugerido que el heteromorfismo de las bandas NOR es más funcional que estructural (López et al., 1989). Se ha propuesto que esta variabilidad en tamaño era ocasionada por diferencias en las cantidades de rDNA (Evans et al., 1974; Hsu y Pardue, 1975). Otra explicación de las diferencias consiste en que la unidad que se repite en el rDNA, difiere en tamaño debido a variaciones en la longitud de las regiones del espaciador que no son transcritas (NTS o Non-Transcriber-Spacer) (Andronico et al., 1985). Por ello, en tanto la caracterización molecular de los rDNA y de las secuencias que los flanquean sean estudiadas, no es posible dar respuesta definitiva a las preguntas sobre la variabilidad de las bandas NOR. Independientemente de estos argumentos, resulta importante determinar además si estos heteromorfismos, representan ganancia o pérdida en las secuencias de la banda NOR, o si son un artificio de la técnica de plata.

En este sentido, se ha observado que las bandas NOR fueron positivas al bandeado C en *Anguilla anguilla*, *A. rostrata* (Sola et al., 1984) y *Muraena helena*, Muraenidae (Cau et al., 1988), pero no en *Ophiusurus serpens*, Ophichthidae (Thode et al., 1985), lo que está en desacuerdo con las observaciones de Rufas et al. (1983), quienes encontraron dependencia entre ambos tipos de bandeado. Por lo anterior la correlación existente entre bandeado C y NORs, es todavía un problema sin respuesta definitiva en los peces.

El heteromorfismo de posición de las NORs, entre *Eucinostomus* y *Eugerres*, puede explicarse por una translocación semejante a la que Gold y Amemiya (1986) detectaron en los ciprínidos. La mayor cantidad de heterocromatina en *Eugerres*, aunque puede entenderse como resultado de los mecanismos de aislamiento reproductivo, y por tanto acompañante o responsable de la formación de estas especies, no puede ser explicado cabalmente, porque no pudo establecerse cuál estadio de tamaño/posición del NOR es el carácter ancestral.

Del escrutinio visual de los cariotipos, resultó que la cantidad de heterocromatina en *Eugerres*, excedía a la cantidad encontrada en *Eucinostomus*. La suma de las longitudes de éstas regiones heterocromáticas, dividida entre la longitud total del genoma (cromosomas), indicó valores de 4 y 3 % respectivamente. Estos valores fueron muy bajos, al compararse con el 35 % obtenido en *Notropis lutrensis* y *N. vetustus*, Cyprinidae (Narayan y Durrant, 1983). En los ciprínidos, el alto porcentaje de heterocromatina ha sido resultado de poliploidizaciones (Yu et al., 1987), por lo que se infiere que la evolución en los gerreidos, ha seguido una ruta evolutiva distinta a la poliploidización.

Las diferencias en posición y tamaño de las NORs, permiten la separación taxonómica entre *Eucinostomus* y *Eugerres*, pero no nos permiten establecer el grado de proximidad de sus relaciones filogenéticas. La precaria identificación de los cromosomas homólogos limitan la realización de un análisis más detallado. Sin embargo, la consistencia de tamaño y posición de las NORs en las especies estudiadas, sugiere que estas variaciones son heredadas somáticamente. Una respuesta definitiva a esta cuestión, sólo puede darse mediante experimentos de cruces.

Los estudios de las bandas cromosómicas obtenidas con endonucleasas de restricción han determinado algunas secuencias de la composición química de las NORs. Estas secuencias han puesto de manifiesto la existencia de una organización de

filamentos con estructura no nucleosómica que facilita la acción de las endonucleasas (Sánchez et al., 1990; Derenzini et al., 1987). Estas experiencias unidas a los conocimientos adquiridos con las nuevas tecnologías moleculares, van a influir el devenir de la citogenética ictiológica y consecuentemente, facilitaran el diseño de métodos, que permitirán resolver algunos de los problemas encontrados durante estos estudios citogenéticos.

b) Alozimas

Los métodos para estudiar los sistemas alozímicos de los gerreidos resultaron útiles, eficientes y económicos.

La medida del grado de identidad alozímica entre las tres poblaciones de mojarra, se usó como criterio objetivo para determinar las relaciones filogenéticas y puede emplearse en la identificación taxonómica.

El método para obtener el cladograma fué el UPGMA. En éste se empleó un algoritmo secuencial de agrupaciones para establecer las relaciones topológicas por orden de similaridad. El algoritmo construya una matriz de distancia evolutiva, o sea una matriz con los números de sustituciones de aminoácidos o nucleótidos, que separan a dos taxa. El primer paso computacional identifica a los dos taxa más similares en la matriz. Estos son unidos en la posición apropiada del cladograma y dibujados a lo largo del eje de distancia. Este elemento de distancia se descarta y el ciclo se repite reiteradamente hasta incluir todas las comparaciones de los elementos de la matriz. En este algoritmo el nivel de agrupación (clustering) o similitud, se calcula a partir de la media aritmética de las distancias, por lo que todos los elementos reciben el mismo valor o peso. Este método presupone una tasa evolutiva constante, es decir, que existe una relación lineal entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia. Esta suposición se satisface al usar medidas lineales de la distancia tales como el número de sustituciones de aminoácidos o de nucleótidos (Nei, 1987). Sin embargo, el método UPGMA

producirá una topología equivocada cuando la tasa evolutiva no es constante, problema que se resuelve utilizando la corrección de distancia transformada. Esta corrección requiere de una comparación con un taxa filogenéticamente relacionado, para identificar a los caracteres que se derivaron (apomorfos) de un carácter homólogo entre todos los taxa. Una vez realizada esta corrección, el UPGMA vuelve a usarse para crear una nueva matriz de distancias e inferir la topología del árbol filogenético. El grupo taxonómico relacionado filogenéticamente (o outgroup), es un taxa que con anterioridad divergió del ancestro común compartido entre el "outgroup" y los taxa estudiados. En los gerreidos se carece de información paleontológica y taxonómica para sustentar una comparación adecuada, y por ello se asumió una tasa evolutiva constante. Esta suposición es comparable con las suposiciones teóricas de los métodos multivariados y los tradicionales. En ellos, al desconocerse los patrones de variabilidad, herencia y plasticidad de los caracteres mensurables bajo diferentes condiciones ambientales, se presupone una tasa evolutiva constante difícil de corroborar.

En el estudio de los 10 sistemas alozímicos, se observaron 3 loci con carácter diagnóstico taxonómico. Estos loci fueron: GPI-músculo, LDH-cojo, MDH-hígado. Los perfiles electroforéticos de estas alozimas, permitieron la separación entre las tres especies de mojarra, por lo que pueden utilizarse como marcadores genéticos. El polimorfismo de estos loci, permitió la identificación específica; sin embargo, su uso para la identificación de larvas e individuos juveniles pudiera estar limitado por falta de información sobre su grado de expresividad durante esas fases del desarrollo ontogenético.

Ninguno de los sistemas alozímicos fué expresado por duplicado, indicando que la evolución en los gerreidos siguió una línea diferente a la poliploidización, corroborando lo que se detectó mediante análisis citogenéticos.

La comparación de las distancias genéticas de las mojarras, con otros valores a nivel genérico reportados en la literatura, mostró que las distancias genéticas fueron pequeñas, y dentro del intervalo observado en otros peces (Avisé y Aquadro, 1982). El intervalo observado en los ciprínidos fué 0.05 a 1.6, y de 0.7 a 1.5 en cíclidos. Estas diferencias pueden explicarse, por diferencias en la tasa de divergencia evolutiva entre los taxa comparados (Gillespie, 1986; Avisé y Smith, 1974; Ayala, 1969).

Las distancias genéticas mostraron que *Eugerres plumieri* y *Diapterus auratus*, se encuentran más cercanas filogenéticamente, que las otras combinaciones de las tres mojarras. Esta distancia, 0.169, considerada dentro de la hipótesis de neutralidad de las mutaciones, en donde la unidad para los peces corresponde a 1-18 millones de años (Gorman et al., 1976; Avisé et al., 1975), permitió estimar que la divergencia ocurrió entre 0.169-3.042 millones de años. Este valor resulta ser un intervalo muy amplio. En los cálculos del reloj molecular proteico se siguen empleando los datos y factores de corrección de vertebrados homeotermos (Kishino y Hasegawa, 1990; Carlson et al., 1978), por lo que la interpretación y su uso, son muy limitados. Estos cálculos son aproximaciones utilizadas comúnmente (Billington et al., 1990), pese a que se demostró que los diferentes sistemas enzimáticos tuvieron tasas evolutivas diferentes (Skibinsky y Ward, 1982). Para obtener resultados más precisos, sería necesario calibrar este reloj molecular en función de las enzimas estudiadas, pero hasta la fecha no hay factores de corrección que pudieran adaptarse a nuestras necesidades. Por otro lado no existe información paleontológica, la única que nos puede brindar un marco de referencia con respecto a la velocidad de evolución sobre los gerreidos, que nos permita verificar las estimaciones del tiempo de divergencia de estos grupos.

Los valores de la heterozigosidad media por locus: 0.034, 0.024 y 0.023 (Tabla 6), fueron bajos al compararse con el valor

de 0.051, promedio calculado en 183 especies de peces (Nevo et al., 1984). Los valores bajos en la heterozigosidad se han correlacionado con la sobreexplotación pesquera (Rivalta et al., 1987), lo que pudiera explicar las observaciones en *Eugerres* y *Diapterus*, especies sometidas a la presión pesquera artesanal, pero no explicaría el resultado en *Eucinostomus*. Si consideramos que los valores de la heterozigosidad son más dependientes del número de loci analizados que del tamaño de la muestra (Sarich, 1977), puede pensarse que los resultados, pudieron haber sido influenciados por el número de loci estudiados. El polimorfismo alozímico resulta de la selección actuando sobre la variabilidad génica de acuerdo con la heterogeneidad ambiental (Gillespie, 1979). Por ello, es más probable que la variación genética ocurra en ambientes variables, que en ambientes estables. Esta correlación entre variación genética y variación temporal del habitat ha tratado de sustentarse, pero las conclusiones alcanzadas no fueron sostenibles (Waples, 1991; Hedrick, 1986). La correlación entre la heterozigosidad de los caracteres poligénicos, y la variabilidad morfológica total fue demostrada en *Cottus*, *Scorpaeniformes* (Strauss, 1991). Otros estudios detectaron correlaciones positivas y negativas, dentro de un intervalo muy amplio, que fue desde no existente hasta moderadamente significativo (Mitton y Grant, 1989). Sin embargo, Smith y Fujio (1982) al analizar la variabilidad genética en 106 especies de teleósteos marinos, encontraron una correlación positiva entre heterozigosidad y especialización en habitat. Lo que permite sugerir que la baja heterozigosidad de los gerreidos está correlacionada con su falta de especialización en habitat. Esta observación de manera indirecta apoya la hipótesis de que el cariotipo ancestral es un caracter generalizado en cuanto a preferencias de habitat.

Las relaciones filogenéticas entre los tres géneros, basadas en la distancia genética, están ilustradas en la Figura 12. La estrecha relación que se observó entre *Eugerres plumieri* y

Diapterus auratus, confirma el arreglo sistemático, a nivel de género, propuesto por Deckert y Greenfield (1987).

La información alozímica resultó adecuada para alcanzar nuestros objetivos. Las características electroforéticas de las tres especies de mojarra, permiten proponer que su similitud morfológica es explicable por su gran semejanza genética, resultado de las estrechas relaciones filogenéticas.

c) ADN mitocondrial

El tamaño del ADN mitocondrial calculado a partir de los pesos moleculares de los fragmentos de restricción, estuvo de acuerdo con los valores encontrados en otros peces (Bird et al., 1986; Berg y Ferris, 1984).

Las pequeñas diferencias en los pesos moleculares totales del mtDNA, obtenidos con las diferentes endonucleasas (Tabla 7), son explicables por la dificultad para detectar fragmentos \pm 60 pb, por lo que las pequeñas variaciones en tamaño del mtDNA a nivel intraespecífico, fueron consideradas producto de la técnica. Este resultado fué similar al de otros estudios, en algunos de los cuales se justificó por este mismo motivo, el combinar tejidos de individuos diferentes para representar una localidad. Por otro lado, las pequeñas variaciones detectadas, contrastan con el polimorfismo en tamaño y la heteroplasmia de *Amia calva*, Amiiformes (Bermingham et al., 1986), aunque en esta comparación, la alejada posición filogenética de *Amia calva*, resulta un factor importante (Normak et al., 1991). La causalidad de las variaciones, de grupos compuestos por cientos de pb de mtDNA, por ejemplo: *Amia calva*, continúan sin explicarse, pero la diferencias de pocos pares de bases, asociadas con algunos cambios patológicos, han podido ser explicadas (Howell et al., 1992; Shoffner y Wallace, 1992). Los efectos del haplotipo patológico sobre el fenotipo, se han documentado en contadas ocasiones (Kobayashi et al., 1991; Sha y Sahgal, 1991), contrastando con *Oncorhynchus clarki lewisi* y *O.*

c. bouvieri, Salmonidae, especies intensamente estudiadas, en las que no se observó correlación entre los haplotipos normales diferentes, y los datos merísticos (Forbes y Allendorf, 1991). Esta información aunada a las características biológicas del mtDNA, permiten predecir que estudios más completos del mtDNA, demostrarán lo inexacto de la supuesta neutralidad de sus mutaciones.

Las topologías de los dendogramas obtenidos con datos de las alozimas, y con la información de los fragmentos de restricción del mtDNA concordaron. Sin embargo, debido a que el número de pb identificados, 172, representaron 0.003 % del mtDNA total, se sugiere ampliar la base de datos de restricción, ya que aún en grupos estudiados intensamente, por ejemplo los salmónidos, se encontró que la tasa evolutiva del mtDNA, fué diferente en todos los miembros de este taxon (Gyllensten y Wilson, 1987), indicando que los datos de divergencia, no son una panacea para entender las relaciones filogenéticas. Su uso fuera del contexto biológico, predispone a cometer errores al comparar especies filogenéticamente cercanas, pero con historias evolutivas diferentes (Shed'ko, 1991). Por ello, la interpretación crítica debe combinar estos datos mitocondriales, con los resultados de otros estudios a diferentes niveles de complejidad biológica.

Los valores de divergencia (Fig. 15) indicaron una separación de 8.5 y de 19.3 %, pero no se estimó la edad de las divergencias, por las imprecisiones en que se incurriría. Por ejemplo, en estudios más completos que utilizaron una batería numerosa de enzimas de restricción, se obtuvieron resultados tan disímiles como 11.1 ± 3.0 millones de años por pareja de bases mediante la estimación basada en el reloj proteico, y de 5.8 ± 1.8 millones de años mediante el ADN mitocondrial, como estimaciones de la divergencia entre *Merluccius capensis* y *M. paradoxus* (Martin et al., 1990; Grant et al., 1988 y Becker et al., 1988). Esta diferencia, se explicó, fué resultado del uso de

factores de corrección inadecuados, deducidos de estudios en primates.

Los valores de las divergencias entre las secuencias del mtDNA fueron ilustrados en la Figura 15. El valor mínimo de la divergencia, 8.5 % entre *Eugerres plumieri* y *Diapterus auratus*, confirma el arreglo sistemático de estos géneros, sugerido por Deckert y Greenfield (1987). Las genealogías de los gerreidos obtenidas por análisis del ADN mitocondrial y por alozimas indicaron una misma topología en el arreglo sistemático. Esta confluencia de los resultados realza el valor del arreglo sistemático, y reitera la validez del cladograma sugerido.

Los perfiles electroforéticos de los fragmentos de restricción con tres endonucleasas, permitieron la identificación de las tres especies de mojarras. Esta información resultó adecuada para alcanzar nuestros objetivos. Sin embargo, se requiere incrementar el tamaño de la base de datos de restricción, antes de que ésta pueda emplearse sin ambigüedad para la identificación taxonómica.

Es preciso advertir que el análisis de ADN mitocondrial con endonucleasas de restricción tiene un alto costo económico. Este factor adquiere importancia cuando se comparan los costos de diferentes tecnologías para resolver un mismo problema biológico.

Globalmente, los resultados de este estudio muestran la validez de los métodos ictiológicos tradicionales que, de hecho, se fundamentan en la comparación de un gran número de caracteres determinados genéticamente, y cuya manifestación puede ser detectada a otros niveles de apreciación. Los estudios citogenéticos, la comparación entre el tipo y frecuencia de las alozimas de las diferentes poblaciones, y la semejanza en el ADN mitocondrial, han confirmado el mismo patrón de relaciones filéticas entre los gerreidos analizados. La aportación fundamental de este trabajo consiste en haber enriquecido cuantitativamente la apreciación cualitativa de las afinidades filogenéticas existentes entre las entidades analizadas.

Conclusiones

Los gerreidos estudiados citogenéticamente, forman un grupo homogéneo, con un genoma nuclear caracterizado por el estadio cariotípico ancestral $2n = 48t$.

Las especies *Eucinostomus argenteus* y *E. harengulus*, no pudieron distinguirse usando características citogenéticas, sin embargo *E. gula* pudo identificarse por la posición de su NOR. *Eugerres plumieri* se identificó por la posición y el mayor tamaño de sus bandas NOR.

Las diferencias en tamaño y posición de las bandas NOR, permitieron la separación entre *Eucinostomus* y *Eugerres*, pero el estadio ancestral de posición y/o tamaño de las bandas NOR no pudo establecerse.

Las relaciones filogenéticas, entre las especies mencionadas anteriormente, no pudieron establecerse, por la ausencia de bandas cromosómicas G. Estas son indispensables para explicar los mecanismos que condujeron a la especiación. La ausencia de bandas G, posiblemente indica que la distribución de G-C es relativamente homogénea en los cromosomas.

Los patrones electroforéticos de las alozimas: GPI-1músculo, LDH-c ojo y MDHhígado permitieron identificar a: *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri* y *Diapterus auratus*.

Las distancias genéticas evidenciaron que *E. plumieri* y *D. auratus* se encuentran filogenéticamente más cercanas, que las otras combinaciones entre esas especies y *E. gula*.

El dendograma de similitud genética apoyó el arreglo sistemático de los géneros, sugerido por Deckert y Greenfield (1987).

El tamaño del mtDNA fué muy parecido entre *E. gula*, *E. plumieri* y *D. auratus*. Los valores de la divergencia entre las secuencias indicaron, 8.5% entre *E. plumieri* y *D. auratus*, y 19.3% entre el nodo de éstas y *E. gula*.

Los perfiles electroforéticos del mtDNA, identificaron a las tres especies, pero se recomienda incrementar el tamaño de la base de datos de restricción, antes de su uso taxonómico.

El dendograma de la divergencia entre las secuencias, tuvo la misma topología que la obtenida con datos alozimicos, confirmando el arreglo sistemático, de estos tres géneros de mojarras, sugerido por Deckert y Greenfield (1987).

BIBLIOGRAFIA

- Aebersold, P.B., G.A. Winans, D.J. Teel, G.B. Milner y F.M. Utter. 1987. Manual for starch gel electrophoresis: A manual for the detection of genetic variation. NOAA Tech. Rep. N.M.F.S. No.61. 19 pp.
- Aguirre León, A. y A. Yáñez Arancibia. 1986. Las mojarras de la laguna de Términos: Taxonomía, biología, ecología y dinámica trófica (Pisces: Gerreidae). An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 13(1): 369-444.
- Aguirre León, A., A. Yáñez Arancibia y F. Amezcua Linares. 1982. Taxonomía, diversidad, distribución y abundancia de las mojarras de la laguna de Términos, Campeche (Pisces: Gerreidae). An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 9(1): 213-250
- Albaret, J.J. y P. Desfossez. 1988. Biologie et écologie des Gerreidae (Pisces, Teleostei) en Lagune Ebrie (Cote d'Ivoire) Rev. Hydrobiol. Trop. 21(1): 71-88.
- Alink, J.M., E.M. Frederix, H. Vander Gaaf, M.A. Vander Kerkoff y C.L.M. Poels. 1980. Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. Mut. Res. 78: 369-374.
- Allendorf, F.W. y S.R. Phelps. 1981. Isozymes and the preservation of genetic variation in salmonid fishes. Ecol. Bull. (Stockholm) 34: 37-52.
- Al-Sabti, K., N. Fijan y B. Kurelec. 1984. Frequency of chromosomal aberrations in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) exposed to detergent and benzene. Vet. Ark. 54: 83-89.
- Alvarez Del Villar, J. 1970. Peces Mexicanos (Claves). Sría. Ind. y Com., Inst. Nal. Invest. Pesq., Serie Invest. Pesq. Estudio No. 1. México. pp. 134-136.
- Amemiya, C.T. y J.R. Gold. 1986. Chromomycin A3 stains nucleolous organizer regions of fish chromosomes. Copeia 1: 226-231.
- Andronico, F., S. De Lucchini, F. Graziani, I. Nardi, R. Batistoni y G. Barsacchi-Piloni. 1985. Molecular organization of ribosomal RNA genes clustered at variable chromosomal sites in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). J. Mol. Biol. 186: 219-229.
- Angel, C. 1975. Contribución a la biología de la mojarra *Eugerres plumieri*. Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle., Venezuela. 36(105): 297-310.

- Arefjev, V.A. 1991. Different rate of intrapopulation chromosome polymorphism in two species of Black sea blennies (Blenniidae, Pisces). *Genetica* 83: 181-187.
- Arkhipchuk, V.V. 1988. Effect of generation time on the rate of evolution of fish karyotypes. *Gidrobiol. J.* 24(2): 90-92.
- Arkhipchuk, V.V. y G.D. Berdyshev. 1988. Relation between DNA quantity, number of chromosomes and evolutionary age of the main taxa of Teleostei. *Zh. Obshch. Biol.* 49(2): 277-281.
- Austin, H.M. 1971. Some Aspects of the biology of the rhomboid mojarra *Diapterus rhombeus* in Puerto Rico. *Bull. Mar. Sci.* 21(4): 886-903.
- Avers, C.J. 1980. *Genetics*. D. Van Nostrand & Co. New York. 659 pp.
- Avise, J.C., W.S. Nelson, J. Arnold, R.K. Kohn, G.C. Williams y V. Thornsteinsson. 1990. The evolutionary genetic status of Icelandic eels. *Evolution* 44(5): 1254-1262.
- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. Saunders y L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4350-4354.
- Avise, J.C. y N.C. Saunders. 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*); Analysis by mitochondrial DNA allozyme markers. *Genetics* 108: 237-255.
- Avise, J.C. y C.F. Aquadro. 1982. A comparative summary of genetic distances in the Vertebrates. *Evol. Biol.* 15: 151-185.
- Avise, J.C., J.J. Smith y F.J. Ayala. 1975. Adaptive differentiation with little genic change between two native California minnows. *Evolution* 29: 411-426.
- Avise, J.C. y M.H. Smith. 1974. Biochemical genetics of sunfish. I. Geographic variation and subspecies intergradation in the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Evolution* 28: 42-56.
- Ayala, F.J. 1978. Molecular genetics and evolution. In: F.J. Ayala (Ed.). *Molecular evolution*. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. pp. 1-20.
- Ayala, F.J. 1969. Evolution of fitness. V. Rate of evolution in irradiated populations of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 790-793.

- Báez Hidalgo, M., L. Alvarez Lajonchere y J. Gómez Hernandez. 1982. Edad y crecimiento de *Eugerres* (Cuvier, 1830) Pisces: Gerreidae en Tunas de Zaza, Cuba. Rev. Inv. Mar., Cuba. 3(3): 117-152.
- Báez Hidalgo, M. 1980. Pesquería de gerreidos (Pisces: Gerreidae) en Tunas de Zaza, Cuba. Rev. Inv. Mar., Cuba. 1(2-3): 89-134.
- Baksi, S.M. y J.C. Means. 1988. Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. J. Fish Biol. 32: 321-325.
- Bartlett, S.E. y W.S. Davidson. 1991. Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48(2): 309-317.
- Becker, I.I., W.S. Grant, R. Kirby y F.T. Robb. 1988. Evolutionary divergence between sympatric species of southern hakes, *Merluccius capensis* and *M. paradoxus*. II. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. Heredity 61: 21-30.
- Bentzen, P., A.S. Harris y J.M. Wright. 1991. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquacultural species of salmonids and tilapia. In: T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys y R. Wolff (Eds.). DNA Fingerprinting approaches and applications. Birkhauser Verlag. Basel. pp. 243-262.
- Berg, W.J. y S.D. Ferris. 1984. Restriction endonuclease analysis of salmonid mitochondrial DNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 1041-1047.
- Bermingham, E., T. Lamb y J.C. Avise. 1986. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. J. er. 77: 249-252.
- Bernardi, G. y G. Bernardi. 1990a. Compositional patterns in the nuclear genome of cold-blooded Vertebrates. J. Mol. Evol. 31: 265-281.
- Bernardi, G. y G. Bernardi. 1990b. Compositional transitions in the nuclear genomes of cold-blooded Vertebrates. J. Mol. Evol. 31: 282-293.
- Berrebi, P., G. Cattaneo-Berrebi y N.L. Brun. 1993. Natural hybridization of two species of tetraploid barbels: *Barbus meridionalis* and *Barbus barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae) in southern France. Biol. J. Linn. Soc. 48: 319-333.

- Billington, N. P.D.N. Hebert y R.D. Ward. 1990. Allozyme and mitochondrial DNA variation among three species of *Stizostedion* (Percidae): phylogenetic and zoogeographical implications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47(6): 1093-1102.
- Bird, T.P. , J.M. Green y W.S. Davidson. 1986. Analysis of mitochondrial DNA in allopatric anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Can. J. Zool.* 64: 118-120.
- Birstein, V.J. 1982. Structural characteristics of genome organization in amphibians: Differential staining on chromosomes and DNA structure. *J. Mol. Evol.* 18: 73-91.
- Black, A. y W.M. Howell. 1978. A distinctive chromosomal race of the cyprinodontid fish, *Fundulus notatus*, from the upper Tombing-bee river system of Alabama and Mississippi. *Copeia* 2: 280-288.
- Blaxhall, P.C. 1983. Chromosomes karyotyping of fish using conventional and G-banding methods. *J. Fish Biol.* 22: 417-424.
- Bohlke, J.E. y C.G.C. Chaplin. 1993. Fishes of the Bahamas and adjacent tropical waters. 2nd. Edition. University of Texas, Austin. pp. 390-396.
- Bohlmeyer, D.A. y J.R. Gold. 1991. Genetic studies in marine fishes. II. A protein electrophoretic analysis of population structure in the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Mar. Biol.* 108: 197-206.
- Brook, I. 1977. Trophic relationships in a seagrass community (*Thalassia testudinum*) in Card Sound, Florida. Fish diets in relation to macrobenthic and cryptic faunal abundance. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 106(3): 219-229
- Brown, W.M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. *In*: M. Nei y R.K. Koehn (Eds.). *Evolution of genes and proteins*. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. pp. 62-88.
- Brown, W.M., M. George y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.
- Buth, D.G. 1986. Locus nomenclature and enzyme staining procedures for teleost fish. Unpublished preliminary data base. Version Sept. 20, 1986. Distribuida por el autor. University of California Los Angeles, Department of Biology. Los Angeles, California 90024. Sin paginar.
- Buth, D.G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 501-522.

- Cano, J., G. Thode y M.C. Alvarez. 1982. Karyoevolutive considerations in 29 mediterranean teleost fishes. *Vie Milieu* 32(1): 21-24.
- Carlson, J.A., A.C. Wilson y R.D. Maxson. 1978. Do albumin clocks run on time? *Science* 200: 1183-1185.
- Cataudella, S., M.V. Civitelli y E. Capanna. 1973. The chromosomes of some mediterranean teleosts: Scorpaenidae, Serranidae, Labridae, Blennidae, Gobiidae (Pisces-Scorpaeniformes, Perciformes). *Bol. Zool.* 40: 385-389.
- Cau, A., S. Salvador, A.M. Deiana, J.L. Bella y R. Mezzanotte. 1988. The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizing regions, and *in situ* digestion with restriction endonucleasas. *Cytogenet. Cell Genet* 47: 223-226.
- Cervigón, F.M. 1966 Los peces marinos de Venezuela. Vol. 2. Est. Invest. Mar. Margarita. Fund. La Salle Cienc. Nat., Caracas. pp. 449-462.
- Chapman, R.W. y D.A. Powers. 1984. A method for the rapid isolation of mtDNA from fishes. Maryland Sea Grant Publ. UM-SG-TS-8405 pp. 11.
- Chen, T.R. 1971. A comparative chromosome study of twenty killifish species of the genus *Fundulus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Chromosoma (Berl.)* 32: 436-453.
- Chingjiang, W., Y. Yuzhen y C. Rongde. 1986. Genome manipulation in carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 54: 57-61.
- Chourrot, D., B. Chevassus y R. Guyomard. 1986. L'amélioration génétique des poissons. *La Recherche* 17(180): 1028-1038.
- Chourrot, D. y A. Happe. 1986. Improved method of direct chromosome preparation in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 52: 255-261.
- Chourrot, D. 1986. Techniques of chromosome manipulation in rainbow trout: a new evaluation with karyology. *Theor. Appl. Genet.* 72: 627-632.
- Crabtree, C.B. y D.G. Buth. 1987. Biochemical systematics of the catostomid genus *Catostomus*: Assessment of *C. clarki*, *C. plebeius* and *C. discobolus* including the zuni sucker *C. d. yarrowi*. *Copeia* 4: 843-854
- Creech, S. 1991. An electrophoretic investigation of populations of *Atherina boyeri* Risso, 1810 and *A. presbyter* Cuvier, 1829 (Teleostei Atherinidae): Genetic evidence in support of the two species. *J. Fish Biol.* 39: 807-816.

- Curran, H.W. 1942. A systematic revision of the gerrid fishes referred to the genus *Eucinostomus* with a discussion of their distribution and speciation. Ph.D. Dissertation. University of Michigan. Ann Harbor. 196 pp.
- Cyrus, D.P. y S.J.M. Blaber. 1984. The feeding ecology of Gerreidae (Teleostei) in the Kosi system, with special reference to their seasonal diet. *Lammergeyer* 32: 35-49
- Cyrus, D.P. y S.J.M. Blaber. 1983. The food and feeding ecology of Gerreidae, Blecker 1859, in the estuaries of Natal. *J. Fish Biol.* 22: 373-393
- Dahle, G. 1991. Cod, *Gadus morhua* L., populations identified by mitochondrial DNA. *J. Fish Biol.* 38: 295-303.
- De Almeida Toledo, L.F., F. Foresti y S. De Almeida Toledo. 1984. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica* 64: 165-169.
- Deckert, G.T. y D.W. Greenfield. 1987. A review of the western Atlantic species of the genera *Diapterus* and *Eugerres* (Pisces: Gerreidae). *Copeia* 1: 182-194.
- Deckert, G.T. 1973. A systematic revision of the genera *Diapterus* and *Eugerres*: with the description of a new genus, *Schisopterus* (Pisces: Gerreidae). Master of Science Thesis. Northern Illinois Univ. Dept. Biology. DeKalb. 74 pp.
- Derenzini, M., D. Hernandez Verdun, F. Farabegolli, A. Pession y F. Novello. 1987. Structure of ribosomal genes of mammalian cells *in situ*. *Chromosoma* (Berl.) 95: 63-70.
- Dowling, T.E., C. Moritz y J.D. Palmer. 1990. Nucleic acids II: Restriction site analysis. In: D.M. Hillis y C. Moritz (Eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts. pp. 250-317.
- Duchac, B. et al.. 1982. Mating behavior and cytogenetic aspects of sex inversion in the fish *Coris julis* L. (Labridae, Teleostei). *Experientia* 38: 809-811.
- Eskinazi, A.M. 1972. Peixes do canal de Santa Cruz - Pernambuco, Brazil. *Trab. Oceanogr. Univ. Fed. PE, Recife.* 13: 283-302.
- Evans, H.J., R.A. Buckland y M.L. Pardue. 1974. Location of the genes coding for 18s and 28s ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma* (Berl.) 48:405-436.
- Fan, Z. y D.P. Fox. 1990. A new method for fish chromosome preparation. *J. Fish Biol.* 37: 553-561.

- Feldberg, E., J.I. Rebelo Port y L.A.C. Bertollo. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachneria* and *Curimatella*. Rev. Brasil. Genet. 15(2): 369-383.
- Ferreiro, C., J.F. Medrano y G.A.E. Gall. 1989. Genome analysis of rainbow trout and sturgeon with restriction enzymes and hybridization with a ZFY gene derived probe to identify sex. Aquaculture 81: 245-251.
- Ferris, S.D., R.D. Sage y A.C. Wilson. 1982. Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. Nature 295: 163-165.
- Fevolden, S.E. y T. Haug. 1988. Genetic population structure of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45(1): 2-7.
- Fields, R.D., K.R. Johnson, G.H. Thorgaard. 1989. DNA fingerprints in rainbow trout detected by hybridization with DNA of bacteriophage M13. Trans. Amer. Fish. Soc. 118: 78-83.
- Fisher, W. (Ed.). 1978. F.A.O. species identification sheets for fishery purposes: Western Central Atlantic. F.A.O. United Nations. Rome. Vol. II.
- Foresti, F., L.F. Almeida Toledo y S.A. Toledo F. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer region in fish. Cytogenet. Cell Genet. 31: 137-144.
- Forbes, S.H. y F.W. Allendorf. 1991. Mitochondrial genotypes have no detectable effects on meristic traits in cutthroat trout hybrid swarms. Evolution 45(6): 1350-1359.
- Gall, G.A.E. 1969. Quantitative inheritance and environmental response of rainbow trout. In: O.W. Neuhaus y J.E. Halver (Eds.). Fish in Research. Academic Press. New York. pp. 177 - 184.
- García, E., M. Alvarez y G.Thode. 1987. Chromosome relationships in the genus *Blennius* (Blenniidae Perciformes) C-banding patterns suggest two karyoevolutional pathways. Genetica 72: 27-36.
- Giles, V., G. Thode y M.C. Alvarez. 1988. Early replication bands in two scorpion fish, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (Order Scorpaeniformes). Cytogenet. Cell Genet. 47: 80-83.
- Gillespie, J.H. 1987. Rates of molecular evolution. Ann. Rev. Ecol. Syst. 17: 637-665.

- Gillespie, J.H. 1979. Molecular evolution and polymorphism in a random environment. *Genetics* 93: 737-754.
- Gold, J.R. 1981. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). VII. Karyotypes of 13 species from the Southern United States. *Cytologia* 46: 105-115.
- Gold, J.R. y C.T. Amemiya. 1986. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XII. Patterns of chromosomal nucleolous organizer region variation among 14 species. *Can. J. Zool.* 64: 1869-1877.
- Gold, J.R., C. Li, N.S. Shipley y P.K. Powers. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J. Fish Biol.* 37: 563-575
- Gold, J.R. y W.J. Karel. 1988. DNA base composition and nucleotide distribution among fifteen species of teleostean fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B(4): 715-719.
- Gold, J.R., K.M. Kedzie, D.A. Bohlmeier, J.D. Jenkin, W.J. Karel, N. Iida y S.M. Carr. 1988a. Studies on the basic structure of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) genome. *Contrib. Mar. Sci.* 30 Supp.: 57-62.
- Gold, J.R., P.K. Zoch y C.T. Amemiya. 1988b. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XIV. Chromosomal NOR phenotypes of eight species from the genus *Notropis*. *Cytobios* 54: 137-147.
- Gonzalez Villaseñor, L.I. y D.A. Powers 1990. Mitochondrial-DNA restriction-site polymorphisms in the teleost *Fundulus heteroclitus* support integradation. *Evolution* 44(1): 27-37.
- Gonzalez Villaseñor, L.I., A.M. Burkhoff, V. Corces y D.A. Powers. 1986. Characterization of cloned mitochondrial DNA from the teleost *Fundulus heteroclitus* and its usefulness as an interspecies hybridization probe. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43(10): 1866-1872.
- Gorman, G.C. y Y.J. Kim. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: Effects of sample size. *Copeia* : 242-249).
- Gosline, W.A. 1971. Functional morphology and classification of teleostean fishes. University Press of Hawaii. Honolulu. 208 pp.
- Graham, M.S., G.L. Fletcher y T.J. Benfey. 1985. Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. *Aquaculture* 50: 133-139.

- Grant, W.S., I.I. Becker y R.W. Leslie. 1988. Evolutionary divergence between sympatric species of southern African hakes, *Merluccius capensis* and *M. paradoxus*. I. Electrophoretic analysis of proteins. *Heredity* 61: 13-20.
- Greenwood, P.H., D.E. Rosen, S.H. Weitzman y G.S. Myers. 1966. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 131: 339-456.
- Grigoryan, K.A. y V.P. Vasil'ev. 1993. Karyotypes of five species of goby (Gobiidae) from the basins of the Black and Caspian seas. *J. Ichthyol.* 33(1): 137-143.
- Gyllensten, U. y A.C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA salmonids: inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. In: N. Ryman y F. Utter (Eds.). *Population genetics and fishery management*. Seattle. Washington Sea Grant Prog. pp. 301-317.
- Han, H.S., H. Mannen, A. Tsujimura y N. Taniguchi. 1992. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in ayu. *Nippon Suis. Gakkaishi* 58(11): 2027-2031.
- Hartley, S.E. 1991a. C, Q, and restriction enzyme banding of the chromosomes in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Artic char (*Salvelinus alpinus*). *Hereditas* 114: 253-261.
- Hartley, S.E. 1991b. Restriction enzyme banding in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*). *Genet. Res., Camb.* 57: 273-278.
- Hedrick, P.W. 1986. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17: 535-566.
- Hochberg, V.B.M. y B. Erdman. 1988. Cytogenetical and morphological consideration on *Rhambdia quelen* (Pisces: Pimelodidae) the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Rev. Brasil. Genet.* 11(3): 563-576.
- Hoese, H.D. y R.H. Moore. 1977. *Fishes of the Gulf of Mexico. Texas, Louisiana, and adjacent waters.* Texas A. & M. Univ. Press. College Station. pp. 194-195.
- Howell, N., D.A. McCullough, I. Kubecka, S. Halvorson y D. Mackey. 1992. The sequence of human mtDNA- The question of errors versus polymorphisms. *Amer. J. Hum. Genet.* 50(6): 1333-1337.
- Howell, W.M. y D.A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer region with a protective colloidal developer: A one step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

- Hsu, T.C. y M.L. Pardue. 1975. Distribution of 18 + 28s ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma (Berl.)* 53: 25-36.
- Hudson, A.P., G. Cuny, J. Cortadas, A.E.V. Haschemeyer y G. Bernardi. 1980. An analysis of fish genomes by density gradient centrifugation. *Eur. J. Biochem.* 112: 203-210.
- Imai, H.T., T. Maruyama, T. Gojobori, Y. Inoue y R.H. Crozier. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. I. The minimum interaction hypothesis. *Amer. Nat.* 128(6): 900-920.
- Karel, W.J. y J.R. Gold. 1987. A thermal denaturation study of genomic DNAs from North American minnows (Cyprinidae: Teleostei). *Genetica* 74: 181-187.
- Kerschner, B.A., M.S. Peterson y R.G. Gilmore Jr.. 1985. Ecotopic and ontogenetic trophic variation in mojarras. *Estuaries* 8(3):311-322.
- Kinkaid, H.L. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* 33: 215-227.
- Kirpichnikov, V.S. 1981. Genetic bases of fish selection. Springer Verlag. Berlin. 410 pp.
- Kishino, H. y M. Hasegawa. 1990. Converting distance to time: Application to human evolution. *Methods in Enzymol.* 183: 550- 570.
- Klinkhardt, M.B. 1991a. Comparison of the karyology (C-banding, Ag-NOR) of eelpout (*Zoarces viviparus*) from the White Sea and the Baltic Sea. *Cytobios* 68: 29-36.
- Klinkhardt, M.B. 1991b. A brief comparison of methods for preparing fish chromosomes: An overview. *Cytobios* 67: 193-208.
- Kobayashi, Y., M.Y. Momei, K. Tominaga, H. Shimoizumi, K. Nihei, M. Yanagisawa, Y. Kawaga y S. Ohta. 1991. Respiration deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial transfer-RNA-Leu(UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Amer. J. Hum. Genet.* 49(3): 590-599.
- Kornfield, I. 1981. Distribution of constitutive heterochromatin and the evolution of sex chromosomes in *Fundulus*. *Copeia* 1: 916-918.
- Kornfield, I.L., U. Rittle, C. Richler y J. Wahrman. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the sea of Galilee. *Evolution* 33: 1-14.

- Landolt, M.L. y R.M. Kocum. 1983. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. In: J.D. Nriagu (Ed.). Aquatic Toxicology. J. Wiley & Sons. New York. pp. 335-352.
- Lanfear, J. y P.W.H. Holland. 1991. The molecular evolution of ZFY-related genes in birds and mammals. J. Mol. Evol. 32(4): 310-315.
- Lansman, R.A., R.O. Shade, J.F. Shapira y J.C. Avise. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. J. Mol. Evol. 17: 214-226
- Lasserre, G. y J.L. Toffart. 1975. Echantillonage et structure des populations ichthyologiques des mangroves de Guadeloupe en September 1975. Cybium 3e. Serie 2: 115-127
- Lee, S.C. y W.C. Chao. 1990. Biochemical systematics of some serranids from Taiwan (Pisces, Serranidae). Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. 28: 183-190.
- LeGrande, W.H. 1981. Chromosomal evolution in North American catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus*. Copeia 1: 33-52.
- LeGrande, W.H. y T.M. Cavender. 1980. The chromosome complement of the stonecat madtom, *Noturus flavus* (Siluriformes: Ictaluridae), with evidence for the existence of a possible chromosomal race. Copeia 2: 341-344.
- LeGrande, W.H. 1975. Karyology of six species of Louisiana flatfishes (Pleuronectiformes: Osteichthyes). Copeia 3: 516-522.
- Levan, A., K. Fredga y A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52(2): 201-220.
- Lewontin, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press. New York. 346 pp.
- Lin, Y. y Y. Ojima. 1987. Studies on developing high resolution BG- and B-banding in fish chromosomes. La Kromosomo II (47-48): 1551-1556.
- Liu, L. 1986. Studies on making fish chromosomes elongated with high resolution G-banding. In: T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi y K. Matsuura (Eds.). Proc. 2nd. Int. Conf. Indo-Pacific Fishes. Tokyo, Japan. Ichthyol. Soc. Japan. pp. 910-917.

- Lockwood, D.H., V.M. Ricardi, S.O. Zimmerman y D.A. Johnston. 1986. Prophase chromosome unique bands sequences: definition and utilization. *Cytogenet. Cell Genet.* 42: 141-153.
- Lopez, J.R., M.C. Alvarez, G. Thode y G. Martinez. 1989. Karyotype divergence in *Symphodus melops* and *Symphodus roissali* (Labridae, Perciformes): C-banded and Ag-NOR karyotypes. *Genome* 32: 35-39.
- Lloyd, M.A., M.J. Fields y G.H. Thorgaard. 1989. Bkm minisatellite sequences are not sex associated but reveal DNA fingerprint polymorphisms in rainbow trout. *Genome* 32: 865-868.
- Lloyd, M.A. y G.H. Thorgaard. 1988. Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 96: 171-177.
- Mago Leccia, F. 1970. Lista de los peces de Venezuela, incluyendo un estudio preliminar sobre la ictiografía del país. *Minist. Agricult. y Cria, Oficina Nal. Pesca. Caracas.* 275 pp.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring Harbor. pp. 150-171.
- Martin, A.P., B.D. Kessing y S.R. Palumbi. 1990. Accuracy of estimating genetic distance between species from short sequences of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 7(5): 485-488.
- Martin, F.D. y R.C. Richmond. 1973. An analysis of five enzyme loci in four etheostomid species (Percidae: Pisces) in an area of possible introgression. *J. Fish Biol.* 5: 511-517.
- Martinez, G., G. Thode, M.C. Alvarez y J.R. López. 1989. C-banding and Ag-NOR reveal heterogeneity among karyotypes of serranids (Perciformes). *Cytobios* 58: 53-60.
- Matheson, R.E. y J.D. McEachran. 1984. Taxonomic studies of the *Eucinostomus argenteus* complex (Pisces: Gerreidae). Preliminary studies of external morphology. *Copeia* 4: 893-902.
- Matheson, R.E. 1983. Taxonomic studies of the *Eucinostomus argenteus* complex (Pisces: Gerreidae). Ph.D. Dissertation. Texas A. & M. University. College Station. 196 pp.
- Mayr, B., M. Kalat, P. Rab y M. Lambrou. 1987. Band karyotypes and specific types of heterochromatins in several species of European percid fishes (Percidea, Pisces). *Genetica* 75: 199-205.

- Medrano, L., G. Bernardi, J. Couturier, B. Dutrillaux y G. Bernardi. 1988. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma (Berl.)* 96: 96-178.
- Meek, S.E. y S.F. Hildebrand. 1925. The marine fishes of Panama. Vol. XV Part II Chicago, Il. Field Museum of Natural History. pp. 581-604.
- Meffe, G.F. 1987. Conserving fish genomes: philosophies and practices. *Environ. Biol. Fish.* 18(1): 3-9.
- Meffe, G.F. 1986. Conservation genetics and the management of endangered species. *Fisheries* 11(1): 14-23.
- Mitton, J.B. y W.M. Lewis. 1989. Relationships between genetic variability and life-history features of bony fishes. *Evolution* 43: 1712-1723.
- Moreira-Fihlo, O. y L.A.C. Bertollo. 1991. Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish. *Rev. Brasil. Genet.* 14(4): 1085-1090.
- Moreira-Fihlo, O., L.A.C. Bertollo y P.M. Galetti. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 564-568.
- Murofushi, M., S. Oikawa, S. Nishikawa y T. Yosida. 1980. Cytological studies on fishes. III. Multiple sex chromosome mechanism in the filefish *Stephanolepis cirrifer*. *Jpn. J. Genet.* 55: 127-132.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, D.G. Buth y C.H. Haufler. 1990. Isozyme electrophoresis. In: D.M. Hillis y C. Moritz (Eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts. pp.45-126.
- Na-Nakorn, U., P. Sidthikrai Wong, W. Tarnchalanukit y T.R. Roberts. 1993. Chromosome study of hybrid and gynogenetic offspring of artificial crosses between members of the catfish families Clariidae y Pangasiidae. *Environ. Biol. Fish.* 37: 317-322.
- Nanda, I., M. Scharl, M. Feichtinger, J.T. Epplen y M. Schmid. 1992. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analyzed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma (Berl.)* 101(5-6): 301-310.
- Narayan, R.K.J. y A. Durrant. 1983. DNA distribution in chromosomes of *Lathyrus* species. *Genetica* 61:47-53.

- Nevo, E., A. Belies y R. Ben-Shlomo. 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates. In: G.S. Mani (Ed.). Evolutionary dynamics of genetic diversity. Lecture notes in Biomathematics. Springer-Verlag. Berlin. pp. 13-213.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press. New York. 512 pp.
- Nelson, J.S. 1984. Fishes of the World. J. Wiley-Interscience Publ. New York. p. 300.
- Normark, B.B., A.R. McCune y R.. Harrison. 1991. Phylogenetic relationships of Neopterygian fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol.Biol. Evol. 8(6): 819-834.
- Ohno, S. 1974. Animal Cytogenetics. In: J. Bernard et al. (Eds.). Vol 4. Chordata. 1. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. Berlin. Gebruder Borntraeger. pp. 1-92.
- Ohno, S. 1970. The enormous diversity in genome sizes of fish as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. Trans. Amer. Fish. Soc. 99(1): 120-130.
- Ohno, S. y N.B. Atkins. 1966. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. Chromosoma (Berl.) 18: 455-466.
- Ojima, Y. y H. Ueda. 1982. A karyological study of the conger eel (*Conger myriater*) in vitro cells, with special regard to the identification of the sex chromosome. Proc. Jpn. Acad. 58B:
- Ojima, Y. y T. Yamano. 1980. The assignment of the nucleolar organizer in the chromosomes of the funa (*Carassius*, Cyprinidae, Pisces). Proc. Jpn. Acad. 56B: 551-556.
- Ozouf-Costaz, C. y F. Foresti. 1992. Fish cytogenetic research: Avances, applications and perspectives. Netherl. J. Zool. 42(2-3): 277-290.
- Park, E.H. y H. Grimm. 1981. Distribution of C-band heterochromatin in the ZW sex chromosomes of European and America eels (Anguillidae, Teleostomi). Cytogenet. Cell. Genet. 31: 167-174.
- Parr, A.E. 1956. On the original variates of taxonomy and their regressions upon size in fishes. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 110(5): 372-397.

- Pechan, P., D.Y. Shapiro y M. Tracey. 1986. Increased H-Y antigen levels associated with behaviorally induced, female to male sex reversal in a coral reef fish. *Differentiation* 31: 106-110.
- Peretti, D., R. Mezzanotte y A.T. Sumner. 1990. Unfixed and fixed human chromosomes show different staining patterns after restriction endonuclease digestion. *Hereditas* 112: 187-192.
- Pezold, F. y J.M. Grady 1989. A morphological and allozymic analysis of species in the *Gobionellus oceanicus* complex (Pisces: Gobiidae). *Bull. Mar. Sci.* 45(3): 648-663.
- Phillips, D.P., C.C. Krueger, G.H. Thorgaard, R.J. Watlendorf y J.E. Clausen. 1986a. Fisheries genetics: where should we be going?. *Fisheries* 11(3): 14-17.
- Phillips, R.B., K.D. Zanicek y P.E. Ihssen. 1989. Population differences in chromosome banding polymorphisms in lake trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 118: 64-73.
- Phillips, R.B., K.A. Pleyte y S.E. Hartley. 1988. Stock specific differences in the number and chromosome positions of the nucleolar organizer regions in the Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Cytogenet. Cell Genet.* 48: 9-12.
- Phillips, R.B., K.D. Zajicek y F.M. Utter. 1986b. Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer regions in *Oncorhynchus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 502-510.
- Phillips, R.B. y P.E. Ihssen. 1986. Inheritance of Q band chromosomal polymorphisms in lake trout. *J. Her.* 77: 93-97.
- Picciolo, A. 1960. The development of the anterior interhaemal cone of *Eucinostomus argenteus* Baird & Girard. *Copeia* 1: 70-71.
- Portela, A.L.B.S., P.M. Galetti y L.A.C. Bertollo. 1988. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces: Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 11(2): 307-316.
- Rab, P., B. Mayr y P. Roth. 1991. Chromosome banding study of European catfish, *Silurus glanis* (Pisces, Siluriformes). *Genetica* 83: 153-157.
- Reddy, P.V.G.K. y G. John. 1986. A method to increase mitotic metaphase spreads and permanent chromosome preparation for karyotype studies in fishes. *Aquacult. Hung.* 5: 31-36.
- Rees, H. 1964. The question of polyploidy in the Salmonidae. *Chromosoma (Berl.)* 15: 275-279.

- Rivalta, V., A. Camacho, A.T. Ramirez y A. Torres. 1987. Las proteínas e isoenzimas en el establecimiento de las relaciones genéticas de algunas especies de la familia Lutjanidae. Acad. Cienc. Cuba. Ciencias Biológicas 17: 49-58.
- Roberts, F.L. 1970. Atlantic salmon (*Salmo salar*) chromosomes and speciation. Trans. Amer. Fish. Soc. 1: 105-111.
- Robins, C.R., R.M. Bailey, C.E. Bond, J.R. Brooker, E.A. Lachner, R.N. Lea y W.B. Scott. 1991. A list of common and scientific names of fishes from the United States and Canada. 5a Ed. American Fisheries Society Spec. Publ. No. 20. Bethesda, Maryland. p. 53.
- Rubio, C.E. 1975. Crecimiento, sexualidad y desarrollo gonadal de la mojarra rayada *Eugerres plumieri* (Cuvier) de la Ciénega Grande de Santa Marta con anotaciones sobre su biología. Divulg. Peq. Inderena., Colombia. 10(1): 1-32, + tablas.
- Rufas, J.S., J. Gozálves, C. Lopez y H. Cardoso. 1983. Complete dependance between AgNORs and C-positive heterochromatin revealed by simultaneous AgNoR C-banding method. Cell. Biol. Inter. Rep. 7: 275-281.
- Ruiz Carús, R. 1993. Chromosomal NORs and C-banding in the common snook *Centropomus undecimalis* (Centropomidae; Pisces), from Florida. Snook Symposium 1993. April 15-16, 1993. Mote Marine Laboratory, Sarasota, Florida. Program and abstracts p. 31.
- Ruiz Carús, R. 1992. Chromosomal NORs and C-banding in the common snook *Centropomus undecimalis* (Centropomidae; Pisces), from Florida. 72nd. Annual Meeting Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. June 4-10, 1992. Univ. of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois. Program and abstracts. p. 160.
- Ruiz Carús, R. 1983. A karyotypic study of *Epinephelus guttatus* (Linnaeus) and *Thalassoma bifasciatum* (Bloch) (Serranidae and Labridae- Pisces). Master of Science Thesis. University of Puerto Rico. Dept. Marine Sciences. Mayagüez. 58 pp.
- Sahota, T.S., F.G. Peet, A. Ibaraki y S.H. Harris. 1986. Chromatin distribution pattern and cell functioning. Can. J. Zool. 64: 1908-1913.
- Sánchez, L., P. Martínez, A. Viñas y C. Bouza. 1990. Analysis of the structure and variability of nucleolar organizer regions of *Salmo trutta* by C-, Ag-, and restriction endonuclease banding. Cytogenet. Cell Genet. 54: 6-9.
- Sarich, V.M. 1977. Rates, sample sizes, and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. Nature 298: 490-492.

- Schultz, L.P. 1949. A further contribution to the ichthyology of Venezuela. Proc. U.S. Nat. Mus. 99(3235): 1-211.
- Schultz, R.J. 1980. Role of polyploidy in the evolution of fishes. In: W.H. Lewis (Ed.). Polyploidy. Biological relevance. Plenum Press. New York. pp. 313-340.
- Sha, A. y V. Sahgal. 1991. Morphometric studies of normal muscle mitochondria. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 23(4): 635-642.
- Shed'ko, S.V. 1991. Rate of mitochondrial evolution in salmonid fishes. J. Evol. Biochem. Physiol. 27(2): 191-195.
- Shelton, W.L., D. Rodriguez y J. Lopez. 1981. Factors affecting androgen sex reversal of *Tilapia aurea*. Aquaculture 25: 59-65.
- Shoffner, J.M. y D.C. Wallace. 1992. Mitochondrial genetics. Principles and practice. Amer. J. Hum. Genet. 51(6): 1179-1186.
- Sindermann, C.J. 1962. Serology of Atlantic clupeoid fishes. Amer. Nat. 96(889): 225-231.
- Skibinski, D.O. y R.D. Ward. 1982. Correlation between heterozygosity and evolutionary rate in proteins. Nature 298: 490-492.
- Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical taxonomy. W.H. Freeman & Co. San Francisco. 513 pp.
- Smith, P.J. y Y. Fujio. 1982. Genetic variation in marine teleosts: High variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists. Mar. Biol. 69: 7-20.
- Sokal, R.R. y P.H.A. Rohlf. 1981. Biometry. 2a. Ed.. W.H. Freeman & Co. San Francisco. 859 pp.
- Sola, L., A.R. Rossi, S. Bressanello, E.M. Rasch y P.J. Monaco. 1993. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. V. Unisexual poeciliids with anomalous karyotypes from northeastern Mexico. Cytogenet. Cell Genet. 63: 189-191.
- Sola, L., P.J. Monaco y E.M. Rasch. 1990. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. Cytogenet. Cell Genet. 53: 148-154.
- Sola, L., B. Camerini y S. Cataudella. 1984. Cytogenetics of Atlantic eels: C- and G-Banding, Nucleolus Organizer Regions, and DNA content. Cytogenet. Cell Genet. 38: 206-210.

- Sprague, L.M., J.R. Halloway y L.J. Nakashima. 1963. Studies of erythrocyte antigens of albacore, bigeye, skipjack, and yellowfin tunas and their use in subpopulation identification. F. A. O. Fish. Rep. 6(3): 1381-1393.
- Strauss, R.E. 1991. Correlations between heterozygosity and phenotypic variability in *Cottus* (Teleostei, Cottidae) - Character components Evolution 45(8): 1950-
- Sturmbauer, C. y A. Meyer. 1993. Mitochondrial phylogeny of the endemic mouthbrooding lineages of Cichlid fishes from lake Tanganika in Eastern Africa. Mol. Biol. Evol. 10(4): 751-768.
- Takai, A. y Y. Ojima. 1986. Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosomes. In: T. Uyeno et al. (Eds.). Proc. 2nd. Int. Conf. Indo-Pacific Fishes. Tokyo, Japan. Ichthyol. Soc. Japan. pp. 899-909.
- Thode, G., M.C. Alvarez, V. Giles y E. García. 1985. Chromosome complement, C-banding, and Ag-NOR location in *Ophiusurus serpens* (Ophichthidae, Anguilliformes). Cytobios 43: 73-77.
- Thode, G., J. Cano y M.C. Alvarez. 1983. A karyological study of four species of mediterranean gobiid fishes. Cytologia (Tokyo) 48(1): 131-138.
- Thorgaard, G.H., P.S. Rabinovich, M.W. Shen, G.A.E. Gall, J. Propp y F.M. Utter. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture 29: 305-309.
- Thorgaard, G.H. 1978. Sex chromosomes in the sockeye salmon: A Y-autosome fusion. Can. J. Genet. Cytol. 20: 349-354.
- Thorgaard, G.H. 1977. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science 196: 900-902.
- Turner, B.J., J.F. Elder, T.F. Laughlin, W.P. Davis y D.S. Taylor. 1992. Extreme clonal diversity and divergence in populations of a selfing hermaphroditic fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10643-10647.
- Turner, B.J., T.A. Grudzien, K.P. Adkinsson y R.A. Worrel. 1985. Extensive chromosomal divergence within a single river basin in the goodeid fish *Ilyodon furcidens*. Evolution 39(1): 122-134.
- Tzeng, C.S. y S.C. Shen. 1990. Mitochondrial DNA identity of *Crossostoma* (Homalopteridae, Pisces) from two river systems of the same geographical origin. Bull Inst. Zool., Academia Sinica 29(1): 11-19.

- Ueda, T., R. Sato y J. Kobagashi. 1988. Silver banded karyotypes of the rainbow trout and their hybrids: disappearance in allotriploid of AgNORS originated from the brook trout. *Jpn. J. Ichthyol.* 63(3): 219-226.
- Ueno, K. y Y. Ojima. 1984. A chromosome study of nine species of Korean cyprinid fishes. *Jpn. J. Ichthyol.* 31(3): 338-344.
- Uribe Alcocer, M. y A. Ramirez Escamilla. 1989. Comparación citogenética entre las especies del género *Dormitator* (Pisces: Gobiidae). *An. Inst. Cienc. del Mar y Limn., Univ. Nal. Aut. México* 16(1): 75-80.
- Uribe Alcocer, M. y J. Arreguín Espinosa. 1989. Los cromosomas de los peces *Oreochromis urolepis hornorum* y *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae). *An. Inst. Cienc. del Mar y Limn., Univ. Nal. Aut. México* 16(2): 189-198.
- Uribe Alcocer, M. 1988. The karyotype of three ariid catfishes from México. *Genome* 30, Suppl. 1: 256.
- Uribe Alcocer, M., J. Arreguín Espinosa y S. Rojas Romero. 1988. The karyotype of the gobiid, *Gobiomorus maculatus*, from México. *Jpn. J. Ichthyol.* 34(4): 509-511.
- Utter, F., D. Teel, G. Milner y D. McIsaac. 1987. Genetic estimates of stock compositions of 1983 chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, harvests off the Washington coast and the Columbia river. *Fish. Bull.* 85(1): 13-23.
- Uyeno, T. y R.R. Miller. 1971. Multiple sex chromosomes in a Mexican cyprinodontid fish. *Nature* 231: 252-253.
- Van der Walt, L.D., F.H. Van der Bank y G.J. Steyn. 1993. Allozyme variation in domesticated African catfish (*Clarias gariepinus*) from the Netherlands. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B(1): 15-18.
- Uwa, H. y L.R. Parenti. 1988. Morphometric and meristic variation in ricefishes, genus *Oryzias*: A comparison with cytogenetic data. *Jpn. J. Ichthyol.* 35(2): 159-166.
- Vitturi, R., E. Catalano y F. Lafargue. 1991. Evidence for heteromorphic sex chromosomes in *Zeus faber* (Pisces, Zeiformes): Nucleolus organizer regions and C-banding pattern. *Cytobios* 68: 37-43.
- Vitturi, R., A. Mazzola, M. Macaluso y E. Catalano. 1986a. Chromosomal polymorphism associated with Robertsonian fusion in *Seriola dumerili* (Risso, 1810) (Pisces: Carangidae). *J. Fish Biol.* 26: 529-534.

- Vitturi, R., E. Catalano, M. Macaluso y B. Zava. 1986b. Karyotypes of nine species of the family Labridae (Pisces). Biol. Zentralbl. 105(5): 519-530.
- Vitturi, R., P. Carbone, E. Catalano y M. Macaluso. 1984. Chromosome polymorphism in *Gobius paganellus*, Linneo 1758 (Pisces, Gobiidae). Biol. Bull. 167: 658-668.
- Wakeman, M. y P.R. Ramsey. 1988. Population structure and genetic variation in red drum. Contrib. Mar. Sci. 30 Suppl.: 49-56.
- Waples, R.S. 1991. Heterozygosity and life-history variation in bony-fishes: An alternative view. Evolution 45(5): 1275-1280.
- Whitmore, D.H. 1983. Introgressive hybridization of a small mouth bass (*Micropterus dolomieu*) and Guadalupe bass (*M. treculi*). Copeia 1983: 672-679.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol.4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press. Chicago. 580 pp.
- Yu, X., T. Zhou, K. Li, Y. Li y M. Zhou. 1987. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. Genetica 72(3): 225-236.

APENDICE

Citogenética:

Solución salina BSS (Ojima et al., 1972)

NaCl.....	7.50	g
KCl.....	0.02	g
NaHCO ₃	0.02	g
CaCl.....	0.02	g
H ₂ O.....	100.00	ml

Solución 2X SSC (Hack y Lawce, 1989)

NaCl.....	17.53	g
Citrato de Na.....	8.82	g
H ₂ O.....	1000.00	ml

Alozimas:

Buffer AC, electrodo pH 7.0

Acido cítrico.....	0.040	M
N-(3-aminopropil)-morfolin, adicionar hasta obtener pH.		
EDTA.....	0.010	M, opcional

se usó en dilución de 1:20

Buffer TBCL, electrodo pH 8.0

Hidróxido de litio.....	0.060	M
Acido bórico.....	0.300	M
EDTA.....	0.010	M, opcional

se usó en dilución 1:10

Buffer TBE, electrodo pH 8.7

Tris.....	0.180	M
Acido bórico.....	0.100	M
EDTA.....	0.004	M

se usó en dilución de 1:4 en el gel

EDTA = sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético

Colorante indicador para la electroforesis de alozimas

Consistió de 1 parte de colorante de alimentos rojo, y 2 partes de rojo de fucsina. Preparándose una solución al 0.1 %, la que se ajustó a un pH de 7.0 con NaOH al 1.0 M.

La composición química de los reactivos usados para la identificación de las alozimas fué:

Aspartato aminotransferasa (AAT)

Tris 0.12 M, Acido cítrico.....	0.02 M
Hidróxido de litio.....	2.4 mM
Acido bórico.....	12.0 mM
Acido Á-ketoglutarico.....	0.22 %
Acido L-aspartico.....	0.50 %
Ajustar a pH 7.5 con KOH, 3.0 M.....	15 ml
Sal de Fast blue BB.....	17 mg
Agar, 2.0 %.....	10 ml

Incubándose en la obscuridad a 37 °C

Creatinina Kinasa (CK)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	15.0 ml
NADP+, 0.25 %.....	0.5 ml
MgCl ₂ , 1.0 M.....	0.25 ml
G6PDH.....	12 unidades
Glucosa.....	100.00 mg
ADP.....	14.00 mg
Fosfocreatinina.....	18.00 mg
Hexokinasa.....	1.50 mg
MTT, 0.5 %.....	0.50 ml
PMS, 0.5 %.....	0.50 ml
Agar, 2.0 %.....	10.00 ml

Incubándose en la obscuridad a 37° C

Fosfoglucomutasa (PGM)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	50.0 ml
MgCl ₂ -6H ₂ O, 0.1 M.....	5.0 ml
Glucosa-1-fosfato.....	0.1 g
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa/NAD-U/ml	1.0 ml
NAD, 10 mg/ml.....	2.0 ml
NBT, 5 mg/ml.....	1.0 ml
PMS, 5 mg/ml.....	1.0 ml

Incubándose a 37° C

Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)

Tris/HCl, pH 8.5, 0.2 M.....	15.0	ml
NAD+, 0.5 %	0.5	ml
Á-Glicerofosfato.....	35.0	mg
Fructuosa-1, 6 difosfato.....	28.0	mg
MTT, 0.5 %.....	0.5	ml
PMS, 0.5 %.....	0.5	ml
Agar, 2.0 %.....	10.0	ml

Incubándose en la oscuridad a 37° C

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	15.0	ml
NADP+, 0.25 %.....	0.5	ml
MgCl ₂ , 1.0 M.....	0.25	ml
Glucosa-6-fosfato.....	50.00	mg
MTT, 0.5 %.....	0.5	ml
PMS, 0.5 %.....	0.5	ml
Agar, 2.0 %.....	10.0	ml

Incubándose en la oscuridad a 37° C

Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	15.00	ml
NADP+, 0.25 %.....	0.50	ml
MgCl ₂ , 1.0 M.....	0.25	ml
G6PDH.....	12	unidades
Fructosa-6-fosfato.....	5.00	mg
MTT, 0.5 %.....	0.50	ml
PMS, 0.5 %.....	0.50	ml
Agar, 2.0 %.....	10.00	ml

Incubándose en la oscuridad a 37° C

L-Iditol deshidrogenasa (IDDH)

Tris/HCl, pH 8.5, 0.2 M.....	13.0	ml
NAD+, 0.5 %	0.5	ml
Sorbitol, 50.0 %	2.0	ml
MTT, 0.5 %.....	0.5	ml
PMS, 0.5 %.....	0.5	ml
Agar, 2.0 %.....	10.0	ml

Incubándose en la oscuridad a 37° C

Lactato deshidrogenasa (LDH)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	13.0 ml
NAD+, 0.5 %.....	0.5 ml
Acido láctico 0.5 M/NaOH ~ 0.5 M, pH 8.0	
.....	2.0 ml
MTT, 0.5 %.....	0.5 ml
PMS, 0.5 %.....	0.5 ml
Agar, 2.0 %.....	10.0 ml

Incubándose en la oscuridad a 37° C

Malato deshidrogenasa (MDH)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	13.0 ml
NAD+, 0.5 %.....	0.5 ml
Acido málico 0.5 M/NaOH ~ 0.1 M, pH 7.0	
.....	2.0 ml
MTT, 0.5 %.....	0.5 ml
PMS, 0.5 %.....	0.5 ml
Agar, 2.0 %.....	10.0 ml

Incubándose en la oscuridad a 37° C

Superoxidasa dismutasa (SOD)

Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 M.....	15.00 ml
MTT, 0.5 %.....	0.50 ml
PMS, 0.5 %.....	0.50 ml
Agar, 2.0 %.....	10.00 ml

Incubándose a 37° C en la oscuridad,
cuando la actividad empezo a aparecer,
se expuso a luz indirecta.

ADN mitocondrial:

MSB-Ca++

Manitol.....	0.21 M
Sucrosa.....	0.07 M
Tris-HCl.....	0.05 M, pH 7.5
CaCl ₂	0.003 M

MSB-EDTA

MSB-Ca++	
EDTA.....	0.01 M

STE

NaCl.....0.1 M
Tris HCl.....0.05 M, pH 8.0
EDTA.....0.01 M, pH 8.0

Endonucleasas de restricción

Las condiciones de almacenaje y dilución para la digestión fueron:

Hae III

Corta al mtDNA en la secuencia: 5'...GG|CC...3'
3'...CC|GG...5'

Condiciones durante el ensayo:

Tris-HCl.....0.001 M, pH 7.5
MgCl₂.....0.007 M
NaCl.....0.060 M
2-mercaptoetanol.....0.007 M
Albumina de suero bovino.....100 mg/ml, 37° C

Condiciones para almacenaje:

Tris-HCl.....0.001 M, pH 7.4
NaCl.....0.400 M
2-mercaptoetanol.....0.007 M
EDTA.....0.0001 M
Albumina de suero bovino.....200 mg/ml
Glicerol.....50 %, -20° C

Hind III

Corta al mtDNA en la secuencia: 5'...A|AGCTT...3'
3'...TTCGA|A...5'

Condiciones durante el ensayo:

Tris-HCl.....0.010 M, pH 8.0
MgCl₂.....0.007 M
NaCl.....0.060 M
2-mercaptoetanol.....0.007 M
Albumina de suero bovino.....100 mg/ml, 37° C

Condiciones para almacenaje:

Tris-HCl.....	0.010	M, pH 7.4
NaCl.....	0.250	M
EDTA.....	0.0001	M
Ditiotreitol.....	0.001	M
Albúmina de suero bovino.....	500	mg/ml
Glicerol.....	50 %	-20° C

Taq I

Corta al mtDNA en la secuencia: 5'...T|CGA...3'
3'...AGC|T...5'

Condiciones durante el ensayo:

Tris-HCl.....	0.010	M, pH 8.4
MgCl ₂	0.007	M
NaCl.....	0.100	M
2-mercaptoetanol.....	0.007	M, 65° C

Condiciones para almacenaje:

Tris-HCl.....	0.010	M, pH 7.5
KCl.....	0.300	M
2-mercaptoetanol.....	0.010	M
EDTA.....	0.0001	M
Albúmina de suero bovino.....	500	mg/ml
Glicerol.....	50 %	-20° C