



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Evaluación de los efectos del insecticida  
organofosforado Metil Paratión en poblaciones  
artificiales del pez amarillo *Girardinichthys*  
*multiradiatus*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

IRENE BARBOSA VALERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. CONSTANTINO MACÍAS GARCIA

MÉXICO, D.F.

Octubre, 2011



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 01 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **BARBOSA VALERO IRENE** con número de cuenta **508450899** con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO METIL PARATION EN POBLACIONES ARTIFICIALES DEL PEZ AMARILLO *GIRARDINICHTHYS MULTIRADIATUS*.”**, realizada bajo la dirección del **DR. CONSTANTINO DE JESÚS MACÍAS GARCÍA:**

Presidente: DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA  
Vocal: DR. OSCAR RÍOS CÁRDENAS  
Secretario: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Suplente: DRA. MÓNICA VANESSA GARDUÑO PAZ  
Suplente: DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**  
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de septiembre de 2011.

*María del Coro Arizmendi*  
**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
**Coordinadora del Programa**

c.c.p. Expediente de la interesada.

## Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Barbosa Valero Irene  
50845089-9  
Maestría en Ciencias Biológicas  
Orientación en Biología Ambiental  
Universidad Nacional Autónoma de México, U.N.A.M.  
Instituto de Ecología  
Ciudad de México, Distrito Federal
  
2. Datos del tutor  
Dr. Macías García Constantino  
Departamento de Ecología Evolutiva  
Instituto de Ecología, U.N.A.M.  
Ciudad de México, Distrito Federal
  
3. Datos de los sinodales
  - a. Presidente  
Dr. José Jaime Zuñiga Vega  
Departamento de Ecología y Recursos Naturales  
Facultad de Ciencias, U.N.A.M.  
Ciudad de México, Distrito Federal
  
  - b. Vocal  
Dr. Oscar Ríos Cárdenas  
Departamento de Ecología Evolutiva  
Instituto de Ecología, UNA.M.  
Xalapa, Veracruz.
  
  - c. Secretaria  
Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.  
Ciudad de México, Distrito Federal
  
  - d. Suplente  
Dra. Mónica Vanessa Garduño Paz  
Departamento de Ecología, Evolución y Conservación de Vertebrados  
Facultad de Ciencias, U.N.A.M.  
Toluca, Estado de México
  
  - e. Suplente  
Dra. Claudia Patricia Ornelas García  
Centro de Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.A.T.  
Tlaxcala, Tlaxcala
  
4. Datos del Trabajo escrito  
Evaluación de los efectos del insecticida organofosforado Metil Paratión en poblaciones artificiales del pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus*  
126 p. 2011.

## Agradecimientos

Quiero inicialmente agradecer a mi familia que me ayudó y me dio fuerzas y motivación a pesar de la enorme distancia física. A mi madre Laura, mi Padre Luiz Fenelon y mis hermanas Patrícia y Carla. A Jacobo, por ser mi apoyo en tantos momentos y por todo el incentivo que le ha dado a mi vida. A sus padres por la generosidad, ayuda y agradable convivencia.

A todos mis amigos del laboratorio de conducta y del Instituto, los que siguen actualmente y los que estuvieron presentes en algún momento. A todos con los que compartí momentos de alegría y diversión.

Quiero agradecer a mi tutor Dr. Constantino Macías por aceptarme y orientarme en la realización de esta tesis. Al comité tutorial; Dra. Maria Eugenia Gonsebatt y Dr. Daniel Piñero, por asesorarme y guiarme durante los años de maestría. A todos los sinodales; Dr. Jaime Zúñiga, Dr. Oscar Ríos, Dra. Maria Eugenia Gonsebatt, Dra. Mónica Garduño y Dra. Patricia Ornelas, por la revisión, las aportaciones y sugerencias a mi trabajo. Al técnico de nuestro laboratorio Edgar Ávila, por toda la ayuda brindada.

También quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, así como al Instituto de Ecología- IE. Al proyecto de PAPIIT n° IN221506 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONACyT por todo el apoyo recibido.

*“This leads me to say a few words on what I have called SEXUAL SELECTION. This form of selection depends, not on a struggle for existence (...), but on a struggle between the individuals of one sex, generally the males, for the possession of the other sex. The result is not death to the unsuccessful competitor, but few or no offspring.”*

(Charles Darwin, 1859)

# ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
1. Introducción.....	01
1.1. Especie de estudio: el pez <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	04
1.1.1. Características del pez <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	04
1.1.2. Distribución geográfica del pez <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	07
1.1.3. Conservación de la Familia Goodeidae.....	08
1.2. Contaminación del ambiente acuático.....	09
1.2.1. El plaguicida organofosforado Metil Paratión.....	12
1.2.1.1. Efectos tóxicos.....	14
1.3. La problemática: el pez y el plaguicida.....	17
2. Objetivos.....	19
3. Hipótesis y predicciones.....	19
4. Métodos generales.....	20
4.1. Colecta, Mantenimiento y Tratamiento de peces.....	20
4.2. Preparación de alimento contaminado.....	24
4.3. Localidad de colecta.....	25
5. Capítulo primero: Características Morfológicas de <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	27
5.1 Talla Corporal.....	27
5.1.1. Objetivos.....	29
5.1.2. Hipótesis y predicciones.....	29
5.1.3. Métodos.....	29
5.1.4. Resultados .....	32
5.1.5. Conclusiones.....	36
5.2. Coloración.....	37
5.2.1. Objetivos.....	41
5.2.2. Hipótesis y predicciones.....	41
5.2.3. Métodos.....	41
5.2.4. Resultados .....	43
5.2.5. Conclusiones.....	51
6. Capítulo segundo: Selección Intersexual en el pez <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	53

6.1. Selección Sexual.....	53
6.1.1 Elección de pareja: el caso de <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	54
6.2. Objetivos.....	57
6.3. Hipótesis y predicciones.....	57
6.4. Métodos.....	57
6.5. Resultados .....	63
6.6. Conclusiones.....	65
7. Capítulo tercero: Parámetros Demográficos de <i>Girardinichthys multiradiatus</i> .....	68
7.1. Demografía y ecotoxicología.....	68
7.2. Objetivos.....	71
7.3. Hipótesis y predicciones.....	71
7.4. Métodos.....	71
7.4.1. Proyecciones poblacionales.....	74
7.5. Resultados .....	76
7.6. Conclusiones.....	88
8. Capítulo cuarto: Organophosphorous exacerbate the demographic consequences of intersexual selection in fish.....	89
9. Conclusiones generales.....	106
10. Referencias bibliográficas.....	110
11. Anexos.....	117

## RESUMEN

Los ecosistemas acuáticos han recibido concentraciones elevadas de contaminantes debido al escurrimiento de los plaguicidas utilizados indiscriminadamente en zonas agrícolas cercanas a cuerpos de agua. Esta contaminación resulta en alteraciones y efectos nocivos para las poblaciones de organismos acuáticos. El pez endémico de México *Girardinichthys multiradiatus* ha sido víctima de esta problemática debido a que su distribución geográfica abarca la región Central de México, una de las más expuestas al uso de insecticidas. Este pez también ha sido un modelo del estudio de elección de pareja dado que la exuberante coloración y cortejo de los machos refleja una intensa selección intersexual. En este trabajo evaluamos las consecuencias de la exposición de poblaciones cautivas de *Girardinichthys multiradiatus* a una concentración previamente establecida como subletal ( $0.005 \mu\text{g/g}$ ) del insecticida organofosforado metil paratió-MeP. Individuos adultos y embriones fueron expuestos a concentraciones subletales a lo largo de cuatro generaciones. Analizamos la morfología de los peces (talla corporal y coloración), el atractivo sexual de los machos, y parámetros demográficos como fecundidad y tasa de crecimiento poblacional. Nuestros resultados indican que adultos expuestos al contaminante no presentan alteraciones morfológicas significativas. Sin embargo, embriones expuestos al MeP sí presentaron perturbaciones en la edad adulta. Los individuos expuestos presentaron patrones de coloración opacos y el atractivo de los machos reducido. A nivel poblacional se observó un aumento de la frecuencia de malformaciones congénitas y de la tasa de mortalidad, una disminución en la fecundidad y por ende una reducción en la tasa de crecimiento poblacional en las generaciones subsecuentes. Proponemos que en especies que presentan intensa presión de selección sexual, como en *Girardinichthys multiradiatus*, la suma de estos efectos representa un riesgo a la sobrevivencia de las poblaciones y a lo largo del tiempo, puede afectar el estatus de conservación de la especie.

Palabras clave: selección sexual, peces endémicos, contaminación, ornamentos, demografía.

## ABSTRACT

Freshwater ecosystems have received high concentrations of pollutants due to runoff of pesticides used indiscriminately in agricultural areas near water bodies. This contamination leads in perturbations and adverse effects to populations of the aquatic organisms. The fish endemic to Mexico *Girardinichthys multiradiatus* has suffered this problem because its geographical distribution covers Mexico's central region, one of the most exposed to pesticides. This fish has also been a model to the mate choice study as the exuberant coloration and courtship of males reflects an intense intersexual selection. We evaluated the effects of exposure of captive populations of *Girardinichthys multiradiatus* at a concentration previously established sublethal (0.005  $\mu\text{g/g}$ ) of the organophosphate insecticide methyl parathion-MeP. Adults and embryos were exposed to sublethal concentrations over four generations. We analyzed fish morphology (body size and coloration), males sexual attractiveness, and demographic parameters as fertility and population growth. Our results indicate that adults exposed do not present significant morphological alterations. However, embryo exposure to MeP resulted in morphological alterations in adulthood. Exposed individuals showed opaque color patterns and males attractiveness reduced. At the population level, there was an increase in the frequency of congenital malformations and mortality, the fertility decreased and thus resulted in a reduction of the growth population rate in subsequent generations. In conclusion, the addition of these effects in species with intense sexual selection pressure, as in *Girardinichthys multiradiatus*, could be a risk to the population survival and over time, can affect the conservation status of the species.

Keywords: sexual selection, endemic fish, pollution, ornaments, demography.

## **1. INTRODUCCIÓN**

En los últimos siglos el crecimiento exponencial de la población humana ha forzado un aumento en la producción de alimentos. El sector agrícola ha utilizado diversas estrategias y tecnologías para elevar su capacidad productiva y así poder suplir la actual demanda de consumo (Nimmo & McEwen, 1994; Marcial y Perez, 2003). Una de ellas es el uso de agroquímicos.

Los agroquímicos, plaguicidas o biocidas son clasificados como sustancias químicas o una mezcla de compuestos químicos cuyo objetivo es matar, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de especies consideradas plagas (Nimmo & McEwen, 1994; Calow, 1998). Naturalmente utilizados desde 1000 a.c., los compuestos químicos empezaron a ser sintetizados artificialmente a partir de los 30's. Originalmente fueron considerados inocuos y altamente efectivos en el combate de plagas e insectos, lo que intensificó su uso en monocultivos de manera descontrolada. No obstante, los primeros efectos adversos de estas sustancias se empezaron a observar décadas después (Nimmo & McEwen, 1994; Calow, 1998).

En la actualidad, el uso indiscriminado de los plaguicidas continúa en aumento. Largamente utilizados en todo el mundo, se estima que existen  $6 \times 10^6$  compuestos químicos sintetizados artificialmente y que cerca de mil nuevos son producidos al año. Solamente Estados Unidos ha registrado más de 50,000 diferentes plaguicidas. No sólo la diversidad de compuestos aumenta, su uso también. Aproximadamente 2,5 millones de toneladas de plaguicidas son empleados al año en los cultivos agrícolas, industrias y consumo doméstico (Nimmo & McEwen, 1994; EPA, 1999).

Uno de los problemas del uso indiscriminado de plaguicidas es su fácil esparcimiento en los diferentes ecosistemas, es decir, la problemática surge cuando se dispersan a medios diferentes de donde originalmente son empleados. El grado de dispersión es dependiente de la composición del contaminante y del medio de donde se encuentra. Pueden ser encontrados en el medio terrestre, aéreo y acuático, más

particularmente en el suelo, en los cuerpos de agua, en sedimentos y en organismos vivos (Nimmo & McEwen, 1994; EPA 1999; Garcia et al., 2003).

Los ecosistemas acuáticos cercanos a zonas agrícolas han recibido elevadas cantidades de agroquímicos. Los contaminantes empleados inicialmente en los cultivos, pueden llegar a los cuerpos de agua debido al escurrimiento durante la temporada de lluvias. Cuando alcanzan los sistemas acuáticos como lagos, lagunas y otros cuerpos de agua, los plaguicidas se dispersan fácilmente y pueden ser incorporados por la biota local (De la Vega Salazar et al., 1997, Calow, 1998).

La incorporación del contaminante se puede dar por bioacumulación directa en los organismos y/o ser transportado a diferentes niveles de la red trófica mediante biomagnificación (Garcia et al., 2003). La bioacumulación sucede debido a la incapacidad de los individuos para metabolizar, transformar, o eliminar completamente la continua asimilación de dichas sustancias. La biomagnificación se da por la ingesta de individuos contaminados (Calow, 1998; Garcia et al., 2003).

El principal conflicto de los insecticidas es que afectan organismos diferentes de los que se quiere eliminar. Se estima que hasta un 90% de los plaguicidas aplicados en la agricultura no alcanza la especie blanco, y no por esto dejan de actuar en las demás especies (Calow, 1998; Sarma et al., 2001). Las especies más afectadas son normalmente consumidores de los niveles tróficos superiores como carnívoros e insectívoros. Los peces frecuentemente son depredadores, disponen de una gran variedad de alimentos, diversidad de sustratos y elevado número de rutas de incorporación de los contaminantes, por lo que pueden reflejar rápidamente los efectos de los contaminantes. Por eso son considerados los organismos centinela de la salud del ambiente acuático (Calow, 1998).

La muerte de organismos por los efectos adversos de contaminantes es un efecto fácilmente reconocible y cuantificable que indica definitivamente las condiciones insatisfactorias de que éstos se encuentren en el ambiente. Mientras tanto, las interacciones y efectos adversos de la exposición a concentraciones subletales de esas sustancias en el ambiente y en los seres vivos, en general, aún se desconocen. En

contraste, las alteraciones neurotóxicas, fisiológicas, y conductuales ocasionados por bajas concentraciones de los contaminantes son complejas para estudiar, analizar y cuantificar (Sheehan et al., 1984). Algunos efectos pueden ocasionar perturbaciones demográficas debido a la disminución en la tasa de reproducción de algunas poblaciones. Esto puede llevar a las poblaciones, incluso a toda la especie, a la extinción, principalmente si presentan características biológicas peculiares como endemismo, viviparidad, selección sexual intensa, tamaño poblacional reducido y distribución geográfica restringida (Sheehan et al., 1984; Sutherland, (b)1998).

En México el uso de plaguicidas se duplicó entre 1980 y 1990 y actualmente sigue en crecimiento principalmente en la región central del país. Esta región contiene un elevado número de especies endémicas en el ambiente dulceacuícola que han sufrido las consecuencias de la exposición a los contaminantes. La familia Goodeidae, en específico la subfamilia Goodeinae, es un ejemplo. Consiste en 19 géneros conformados por aproximadamente 40 especies de peces vivíparos, todas endémicas y la mayoría clasificada con algún nivel de riesgo de extinción (De La Vega Salazar & Macías Garcia, 2005). De hecho, es considerada como una de las subfamilias de peces con mayor riesgo de extinción en el mundo (Dominguéz et al., 2008).

La especie *Girardinichthys multiradiatus*, comúnmente conocida como pez amarillo pertenece a esta subfamilia y presenta características ecológicas peculiares que pueden dificultar la reproducción, supervivencia y conservación de la especie (ver apartado 1.1), lo que sensibiliza a evaluar las posibles consecuencias de concentraciones subletales de los insecticidas en parámetros morfológicos, de selección sexual y demográficos en esta especie a lo largo de las generaciones.

## 1.1 Especie de estudio: el pez *Girardinichthys multiradiatus*

El pez teleósteo *Girardinichthys multiradiatus* pertenece a la familia Goodeidae, subfamilia Goodeinae, clasificado dentro del Orden Cyprinodontiformes. Las características biológicas y ecológicas del pez *G. multiradiatus*, comúnmente conocido como pez amarillo, son estudiadas desde su registro (Meek, 1904), pero sólo después de su re-descripción morfológica (Romero, 1965) se ha adquirido mayor conocimiento de esta especie.

### 1.1.1 Características del pez *Girardinichthys multiradiatus*

La especie *G. multiradiatus* está compuesta por peces adultos de tamaño pequeño, longitud estándar (LE) no mayor a 50 mm, cuyas hembras son normalmente un poco mayores que los machos. Presenta un dimorfismo sexual caracterizado por el tamaño y la coloración de las aletas de los machos. Las aletas dorsal, ventral y anal son proporcionalmente mayores que las aletas de las hembras y que las de otros Goodeidos. La pigmentación contrastante de amarillo intenso con manchas y tonos oscuros que los machos presentan en sus aletas es lo que le confiere el nombre común de pez amarillo (Macías García, 1991; Macías García *et al.*, 1994; ver en Fig. ).



Individuos de *Girardinichthys multiradiatus*. El macho se encuentra en la parte superior y la hembra en la inferior. Fotografía; S. A. Webb.

La conducta reproductiva de esta especie es considerada una de las más complejas de la familia Goodeidae. Los machos presentan un cortejo con hasta 6 componentes conductuales diferentes como despliegues y dobléz de las aletas dorsal, ventral y caudal; seguir y nadar de modo sincronizado y paralelo a la hembra culminando en una secuencia elaborada de movimientos circulares conocida como el “baile del ocho” por la figura que compone (Macías Garcia, 1991; Macías Garcia *et al.*, 1994; Méndez, 2011).

Las hembras suelen preferir a machos de mayores tallas corporales, con mayor volumen y más pigmentados. Para su elección utilizan la coloración de las aletas de los machos además de la reflectancia de ultravioleta (UV) de regiones centrales de su cuerpo. También prefieren a machos que despliegan sus conductas de cortejo de manera más completa y con mayor frecuencia de cortejo. (Macías Garcia, 1991; Macías Garcia *et al.*, 1994; Macías Garcia & Burt de Perera, 2002; Burt de Perera & Macías Garcia, 2003, ver 1.1.1).

*G. multiradiatus* es una especie con fertilización interna y sistema polígamo de apareamiento. La hembra no posee espermateca por lo que no es capaz de almacenar el esperma de los machos. Esto no impide la posibilidad de múltiples fertilizaciones, de competición espermática y de paternidad múltiple (ver 6.1.; Fitzsimons, 1972; Macías Garcia & Saborío, 2004). La aleta anal de los machos es denominada espermatodio, tiene forma de lóbulo copulatorio y está modificada para fines de inseminación (Díaz-Pardo, 2005), pero en contraste con machos de otras especies similares (eg. familia Poeciliidae; ver 1.1.4.), los machos de *G. multiradiatus* no pueden ni forzar ni robar cópulas (Macías-García *et al.*, 1998). Las hembras pueden rechazar el apareamiento de manera efectiva en caso de que el macho no les resulte atractivo, es decir, para que la fertilización suceda, es indispensable el consentimiento de las hembras (Macías Garcia *et al.*, 1994; Macías Garcia *et al.*, 1998).

El pez *G. multiradiatus*, al igual que otros goodeidos, tiene adaptaciones morfológicas reproductivas poco comunes como viviparidad, estructura única del ovario y desarrollo embrionario diferencial. Son considerados vivíparos verdaderos o matrotrofos, es decir, el desarrollo de los embriones ocurre dentro del cuerpo de la

madre y los embriones obtienen los alimentos directamente de ella durante la gestación y no del vitelo del huevo (Wourms, 1981; Uribe *et al.*, 2005). Una porción del intestino de los embriones protruye formando una estructura externa conocida como trofotenia. Este órgano especializado es lo que permite a los embriones asimilar los nutrientes tales como aminoácidos y lipoproteínas que la madre secreta en su lumen ovárico. Su epitelio repleto de mitocondrias sugiere transporte transmembranal activo de macromoléculas por mecanismos de endocitosis (Fig. 1.2; Lombardi & Wourms, 2005; Schindler, 2005, Uribe *et al.*, 2005;).

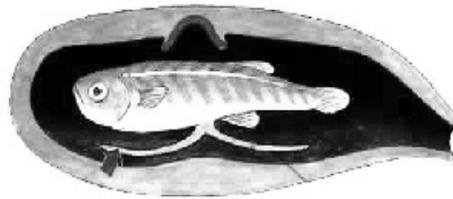


Fig. 1.2. Trofotenia en un esquema. Fuente; G. Ellenberg en *Viviparous fish*, 2005.

El crecimiento de machos y hembras es alométrico. Las hembras se desarrollan y crecen gradualmente mientras que la diferenciación sexual de los machos se puede dar a partir del primer mes de edad siendo normalmente el primer carácter sexual dimórfico visible sus aletas impares. Los individuos tardan cerca de tres meses en llegar a adultos reproductivos. Las hembras en cautiverio pueden reproducirse hasta dos temporadas por año presentando un tiempo aproximado de gestación de dos meses ( $53 \pm 7.9$  días). Tardan entre dos horas hasta dos días para parir, dependiendo del número de críos entre 5 hasta 50 y tras el parto se encuentran listas para copular nuevamente (Macías García *et al.*, 1994; Saborío, 2002).

La proporción sexual en *G. multiradiatus* que Del Villar (1949) encontró en poblaciones de la cuenca del Pánuco en 1949 fue de 0.3:1. En poblaciones del Alto Lerma se han registrado proporciones sexuales variables en los adultos. En Ixtlahuaca (Fig. 1.3) se encontró la menor proporción de 0.5:1. En Acambay y Zempoala (Fig. 1.3) también se encontraron más hembras que machos, 0.6:1 y 0.9:1, respectivamente (Macías García, 1994). Todas las proporciones son representadas en machos:hembras.

### 1.1.2 Distribución geográfica de *Girardinichthys multiradiatus*

El pez amarillo *G. multiradiatus* es endémico de la región sureste de la Faja Volcánica Transmexicana-FVTM en la parte central de México. Su distribución geográfica es restringida a ríos, lagos y presas en un área de menos de 11000 km<sup>2</sup> al oeste de la ciudad de México, donde convergen tres importantes sistemas hidrológicos del país; el Alto Lerma, Pánuco (río Tula) y algunos ríos tributarios del Balsas. De las tres cuencas, el Alto Lerma es la más representativa de la distribución de *G. multiradiatus* al albergar cerca de 70% de su hábitat y la mayoría de sus poblaciones (Fig. 1.2; Meek, 1904; Del Villar, 1949; Miller & Smith, 1986; Webb *et al.*, 2004; Miller, 2005; Gesundheit & Macías Garcia 2005).

Son considerados peces tropicales, no obstante, se encuentran en hábitats templados con temperaturas variables entre 14 y 27° C, a una latitud entre 19 y 20°, con gradiente de altitudes entre 800 y 3000 msnm. Se localizan en las orillas de los cuerpos de agua, en zonas someras de hasta 1.2 m de profundidad, con vegetación ribereña o sumergida y oxígeno disuelto entre 4.5 y 15 m/L y pH de 7.6 a 7.7 (Del Villar, 1949; Miller, 2005; Gesundheit & Macías Garcia, 2005).

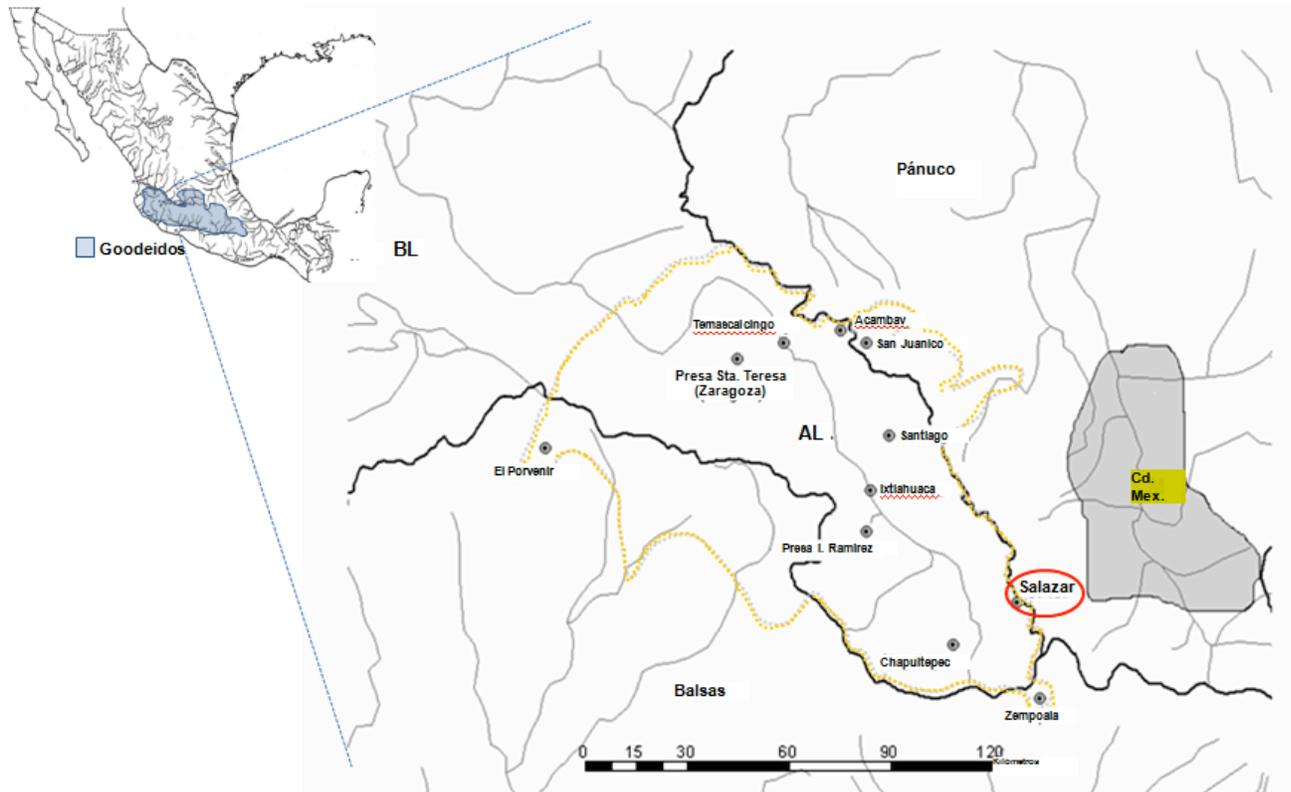


Fig. 1.3. Distribución geográfica de *G. multiradiatus*. Fuente; Modificado de Macías-García, 2010. BL: Bajo Lerma. AL: Alto Lerma. Líneas oscuras: división de cuencas hidrológicas. Líneas claras: ríos que forman las cuencas. Línea de puntos: distribución geográfica de *Girardinichthys multiradiatus*.

### 1.1.3 Conservación de la Familia Goodeidae y de *Girardinichthys multiradiatus*

La fauna ictiológica de México cuenta con 506 especies de peces continentales y de éstas 32% son especies endémicas (Miller, 2005). La familia Goodeidae es la más destacada en la región Central de México, donde de un total aproximado de 70 especies endémicas esta familia presenta 42 especies (Miller & Smith, 1986; Webb *et al.*, 2004; Miller, 2005). De éstas, tres están extintas en la naturaleza, ocho se encuentran en peligro de extinción y las restantes están clasificadas con algún nivel de riesgo (Díaz-Prado *et al.*, 1993; De La Vega Salazar *et al.*, 2003; De La Vega Salazar & Macías García, 2005; Uribe & Grier, 2005).

La especie *G. multiradiatus* está clasificada como especie vulnerable en la lista roja de la IUCN-2011, sin embargo no se encuentra registrada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001. SEMARNAT, 2002). Esta contradicción debe ser

porque es considerada una de las más abundantes de la familia pero no se excluye la posibilidad para éstas, ni para otras, que aumente su riesgo de extinción (De La Vega Salazar & Macías Garcia, 2003).

Los goodeidos, particularmente *G. multiradiatus* tienen una distribución geográfica restringida. Sus características reproductivas como la viviparidad matrotrofica y sus características biológicas como una fuerte selección sexual, son factores relevantes que aumentan el riesgo de la disminución del tamaño de las poblaciones. Es importante destacar que entre los principales factores agravantes del declive poblacional de los Goodeidos están la destrucción y contaminación de su hábitat natural, la creciente fragmentación, eutrofización e introducción de especies exóticas (Díaz-Pardo *et al.*, 1993; De La Vega Salazar & Macías Garcia, 2005).

## **1.2 Contaminación en el ambiente acuático**

La contaminación de los ecosistemas naturales es una de las principales consecuencias de la perturbación antropogénica de la actualidad. Entre todos los tipos de contaminación que el medio ambiente ha sufrido, la exposición a plaguicidas sigue aumentando descontroladamente. Debido al creciente uso de nuevas sustancias desarrolladas por la industria y tecnología, es cada vez más frecuente el desecho de estos compuestos a los cuerpos de agua, lo que contribuye a que un gran número de productos químicos y sintéticos entren al medio ambiente (Albert, 1985; Calow, 1998).

La contaminación del ambiente acuático se ha vuelto un problema grave en lagos, lagunas, presas y ríos (Nimmo & McEwen, 1994; Marcial y Perez, 2003). El grado de impacto en los sistemas acuáticos depende de algunos factores como la concentración eliminada del contaminante, la persistencia de éste y las características físico químicas del compuesto y del cuerpo de agua receptor. Algunos de los plaguicidas que fácilmente se encuentran en los cuerpos de agua son: DDT-dicloro-

difenil-tricloroetano, carbaril, endosulfan, aldrin, malatión y metil paratión (Nimmo & McEwen, 1994; Calow 1998).

La contaminación de los cuerpos de agua normalmente se da por escurrimiento del contaminante inicialmente utilizado en los cultivos agrícolas. Sin embargo, también se ha aplicado el contaminante directamente a los cuerpos de agua. En la década de 80, se inició en Cuba, un programa de combate al mosquito del dengue (*Aedes aegypti*) donde se aplicaron insecticidas organofosforados como malatión y otros compuestos metilados directamente al agua. Los efectos en los demás organismos acuáticos, así como un desequilibrio ecológico y la resistencia a estos insecticidas por otro mosquito (*Culex quinquefasciatus*), se dieron a conocer años después (Aguilera et. al., 1995).

El aumento progresivo de la contaminación de los cuerpos de agua por pesticidas y la bioacumulación de contaminantes afecta procesos biológicos como el desarrollo, el crecimiento, la reproducción e incluso la supervivencia de muchos organismos (Calumpang et al., 1997). La exposición a contaminantes afecta desde varias rutas. Puede afectar directamente la fisiología y la morfología de los organismos pero la alteración también puede ocurrir a nivel conductual. Por ejemplo, los peces *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* y *Oncorhynchus mykiss* expuestos a concentraciones subletales de contaminantes pesados (Pb) no demostraron alteraciones morfológicas pero tuvieron hiperactividad, respuesta tempo-espacial y actividad locomotora alteradas, es decir, presentaron perturbaciones en su conducta debido a la interferencia en el sistema neurológico (Weber & Dingel, 1997). Estas perturbaciones conductuales se reflejan en otros parámetros como forrajeo anómalo y baja respuesta anti-depredación (Pal & Konar, 1985).

Más específicamente, los contaminantes pueden alterar la proporción sexual, inducir mutaciones en el material genético alterando su diversidad y frecuencia genética y, dependiendo de la toxicidad de la substancia, cambiar la estructura y la dinámica poblacional de las especies (Sheehan et al., 1984, Moriaty, 1999). Un ejemplo de esto, es la alteración que la exposición a concentraciones crecientes de un contaminante ocasionó en la estructura poblacional del plancton en un ambiente dulceacuícola. Las *Daphnia sp.* fueron las primeras en desaparecer, lo que proporcionó que los

organismos de los cuales se alimentaba, principalmente algas, bacterias y copépodos (*Skistodiaptomus sp.* y *Mesocyclops sp.*) se reprodujeran y crecieran abundantemente ocasionando un desequilibrio importante en esta comunidad acuática (Havens, 1994; Duquesne, 2006).

En México, los desechos industriales, el drenaje urbano y los plaguicidas contaminan los ríos y cuerpos de agua en todo el país. En la región central, cuatro de los ríos más importantes se encuentran expuestos a contaminantes: Lerma-Santiago, Pánuco y Balsas. Estos ríos son primordiales hábitats de especies nativas y endémicas tanto de flora como de fauna (Sarma et al., 2001, De la Vega Salazar et al., 1997; Miller & Smith, 1986). La cuenca Lerma-Chapala ubicada en la región central de México abarca una zona con alta riqueza de endemismos, en especial de la ictiofauna mexicana. (Arriaga *et al.*, 2000). Sin embargo, enfrenta una fuerte presión sobre sus recursos hídricos debido a que es un área con elevada actividad agrícola y pecuaria además de ser la región más densamente poblada del país. Se estima que el 70% de la población y el 67% de la actividad industrial ocurren en esta área, y son abastecidos por apenas 20% del agua superficial (Dominguez-Dominguez, 2006).

La perturbación antropogénica de los últimos 50 años en esta zona generó un cambio de uso de suelo por deterioro ambiental y un proceso de desecación de las áreas cercanas a los cuerpos de agua debido a la intensa actividad agrícola. Estas actividades contribuyen para el uso elevado y continuo de compuestos químicos en la región (Caire, 2004). Esto fue corroborado por la CONABIO en 2005 cuando declaró que los agroquímicos son los principales causantes del deterioro de la calidad del agua del río Lerma (INEGI, 2003; CONABIO, 2005).

Por todo lo anterior, se hace necesario estudios de los efectos adversos en los organismos acuáticos, particularmente en peces, ocasionados por el uso de contaminantes. En esta ocasión se observaron los efectos de un plaguicida comúnmente utilizado en la región, el organofosforado metil paratión.

### 1.2.1. El plaguicida organofosforado Metil Paratión-MeP

Los organofosforados-OP son un grupo de compuestos que fueron inicialmente utilizados como armas químicas en la Segunda Guerra Mundial. Sin embargo, posteriormente, en los años 50's, su uso cambió y pasaron a ser utilizados como plaguicidas e insecticidas en el cultivo de plantaciones como soya, maíz, trigo, arroz, frijol, algodón, cebada, alfalfa, manzanas y duraznos, entre otros (Sarma *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003; Edwards & Tchounwou, 2005). Los plaguicidas inicialmente aplicados en los cultivos se drenan en el suelo y se dispersan por percolación y de esta manera escurren y alcanzan los cuerpos de agua. La contaminación es más aguda en los sitios de desagüe pero la elevada dispersión en el medio acuático posibilita su esparcimiento a localidades próximas (Walker *et al.*, 1996).

Los organofosforados son compuestos lipofílicos por lo que se pueden dispersar fácilmente en el ambiente. Usualmente son menos estables que los organoclorados por ser fácilmente degradados por agentes químicos o biológicos, es decir, su persistencia en el ambiente es relativamente corta. Debido a esto su contaminación generalmente se debe a una toxicidad aguda, de corto plazo (Walker *et al.*, 1996).

Los organofosforados son sustancias químicas producidas a partir de la reacción de un alcohol con un ácido fosfórico. Esta reacción origina un grupo de compuestos que puede ser subdividido de acuerdo a su estructura química en fosforotiatos (i.e. metil paratión, paratión, fenitrotión y diazinón) y fosforoditiatos (i.e. malatión, dimetoato y azinfosmetil; Jakanovic, 2001; Garcia *et al.*, 2003). El Metil Paratión-MeP, también conocido como O,O-dimetil O-p-nitrofenil fosforotioato ( $C_8H_{10}NO_5PS$ ), es un organofosforado creado en los años 30s en los Estados Unidos. Su toxicidad se hizo notoria en 1954, cuando se observaron consecuencias de sus efectos neurotoxicológicos, pero su uso sólo fue prohibido hasta el año de 1978 en ese país. En la actualidad la prohibición del uso de este compuesto se ha extendido en muchos países, sin embargo, su uso continúa ilegalmente como insecticida doméstico o en pequeños cultivos. No obstante, en México, como en otros países, todavía se permite la utilización del MeP a pesar de sus efectos negativos en los ecosistemas como la contaminación del suelo y la disminución de la calidad del agua (Bueno *et al.*

1996; Walker *et al.*, 1996; Sarma *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003, Edwards & Tchounwou, 2005).

La eficacia del MeP como insecticida contribuyó para que fuera ampliamente utilizado y fácilmente dispersado. El MeP es un plaguicida considerado de alta eficacia debido a diversos factores. Su presentación comúnmente en forma líquida facilita la mezcla y dilución con otros compuestos y el rocío del producto en los cultivos, además el bajo costo lo torna atractivo a los agricultores (Walker *et al.*, 1996; Sarma *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003).

Considerando los factores físico-químicos, el MeP tiene un valor (K) de coeficiente de partición del carbono orgánico ( $K_{oc}$ ) igual a 476, un coeficiente de partición octano/agua ( $K_{ow}$ ) de 2.68 y una solubilidad en agua de 55 mg/L. Tiene una vida media en aguas de río de 24.6 días y en lagos de 25.6 días y peso molecular de 263.23. El conjunto de estos factores físico-químicos indica que es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, como etanol o cloroformo, pero además, es ligeramente soluble en solventes inorgánicos como en aceites minerales. También puede ser dispersado a regiones vecinas por la lluvia, el viento y la niebla. La degradación del MeP se puede dar por fotólisis y/o por biodegradación provocada por los microorganismos del suelo y del agua (ECOTOXNET, 1996; Bueno *et al.* 1996; Walker *et al.*, 1996; EPA, 1999; Garcia *et al.*, 2003).

La principal problemática consiste en que el MeP se incorpora en los organismos cuando estos se encuentran expuestos a ambientes contaminados. Este contaminante tiene la capacidad de bioacumularse en los seres vivos, ocasionando perturbaciones fisiológicas y ecológicas, tanto directas como indirectas y en diferentes niveles (i.e. conducta y morfología del individuo, demografía y en el ecosistema; ECOTOXNET, 1996; Bueno *et al.* 1996; Walker *et al.*, 1996; EPA, 1999; Garcia *et al.*, 2003).

### 1.2.1.1. Efectos tóxicos

La toxicidad de este organofosforado es debida a la elevada neurotoxicidad del compuesto. El principal mecanismo de toxicidad consiste en inhibir la actividad catalítica de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable por la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh). La ACh estimula la respuesta pos-sináptica en el sistema nervioso periférico (SNP), en el sistema nervioso central (SNC) y en la conexión neuromuscular. Sin la degradación de la ACh, ésta se acumula en los receptores sinápticos del SNP y SNC ocasionando una hiperestimulación del sistema colinérgico. Sin embargo, puede ser parcialmente metabolizado por la actividad de las monooxigenasas P450 en las células hepáticas. La degradación del MeP origina dos nuevos metabolitos, el 4-nitrofenol (4-NP) y el metil paraoxon que también es un inhibidor de la AChE con potencial de acción de hasta tres órdenes de magnitud mayor que el MeP. Ambos compuestos son posteriormente desmetilados (Chambers et al., 1991; Garcia-Repetto et al., 1997; Jakanovic, 2001; Vittozzi, 2001; Garcia *et al.*, 2003).

Otro mecanismo de toxicidad consiste en la bioacumulación del MeP por su característica lipofílica. El MeP se acumula fácilmente en los tejidos adiposos, en el músculo, en glándulas, gónadas y en órganos como hígado, riñones y cerebro (Vittozzi *et al.*, 2001; ECOTOXNET, 1996; Garcia-Repetto *et al.* 1997; Fanta *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2003). El almacenamiento en los tejidos puede ocurrir por largos periodos de tiempo, sin embargo, es temporal. Cuando los depósitos de grasa son requeridos por el organismo, el MeP es liberado y los efectos tóxicos antes descritos (Jakanovic, 2001; Vittozzi, 2001; Garcia *et al.*, 2003).

Si la contaminación es crónica, los individuos pueden desarrollar o activar mecanismos de desintoxicación y resistencia para tratar de evitar el daño. Los mecanismos de tolerancia utilizados van desde la metilación de proteínas, el uso de anti-oxidantes hasta la reparación del material genético-ADN. Sin embargo, todas estas opciones demandan un gasto de energía elevado ocasionando una disyuntiva entre la energía disponible para realizar actividades metabólicas o para desintoxicarse. Si el organismo invierte recursos para su desintoxicación, su probabilidad de mortalidad se ve reducida, pero también ocurre una disminución en su tasa metabólica (Walker et al.,

1996). Sin embargo, los embriones no responden a la intoxicación de organofosforados del mismo modo. Se ha observado que en ratas los individuos presentaron un potencial de desintoxicación significativamente menor durante el desarrollo embrionario que cuando adultos. Asimismo, una exposición crónica durante el desarrollo embrionario ocasionó daños irreversibles en el crecimiento, diferenciación y maduración de células neurales (Lassiter et al., 1998; Das & Barone, 1999; Garcia et al., 2005; Timofeeva et al., 2008).

El MeP actúa como inmunosupresor, es decir, afecta el sistema inmune de los individuos. La reacción oxidativa puede afectar otras rutas del metabolismo de los organismos además del sistema inmune. La biotransformación oxidativa en la cual se genera una elevada concentración de radicales libres y/o compuestos oxido-reactivos afecta la oxidación de proteínas y lípidos lo que resulta en daños en las membranas celulares o incluso en el ADN (Jakanovic, 2001; Vitozzi, 2001; Garcia et al., 2003). Existen mecanismos intracelulares de anti-oxidación que procesan los radicales liberados durante procesos metabólicos. Estos procesos suelen ser altamente costosos para la célula, por demandar elevadas cantidades de energía. En condiciones de exposición a OP los mecanismos intracelulares estarían sobrecargados para enfrentarse con la toxicidad además de realizar su función. Así mismo, compuestos estructurales anti-oxidantes como los carotenóides, se ven obligados a re-direccionar su función para combatir los efectos tóxicos de los radicales oxidativos liberados (Walker et al., 1996).

Los organofosforados ocasionan daños en diferentes niveles del organismo, como daño celular, en tejidos y órganos, daño fisiológico, morfológico, metabólico y reproductivo. Se han observado daños en el sistema nervioso (SN), daños histopatológicos, mal funcionamiento de órganos y glándulas e inmunotoxicidad. En una exposición crónica los efectos colaterales pueden ocurrir durante el desarrollo en las glándulas secretoras (sudores, secreciones anormales de saliva y lagrimeo); en el tracto gastrointestinal (náuseas, vómitos y diarrea); en el SN (vértigos, convulsiones, disturbios cardíacos, respiratorios y en casos extremos hasta la muerte por asfixia),

entre otros (Walter *et al.*, 1996; Bianchini & Monserrat, 2001; Garcia *et al.*, 2003; Garcia-Repetto *et al.* 1997; Fanta *et al.*, 2003).

La intensidad de los efectos tóxicos ocasionados por la contaminación de organofosforados depende de diversos factores: el tiempo de exposición, la concentración del contaminante, las rutas de absorción (vía oral, respiratoria o dérmica) y la combinación de estos factores. Los efectos también varían de acuerdo con la edad y el género de los individuos. Aunque la concentración letal 50 (LD50 del MeP) es mayor en el sexo femenino, esta condición se revierte en estadios de embarazo, donde la actividad del citocromo P450 disminuye, dificultando el metabolismo del contaminante. Finalmente, la variación genética que existe en los individuos puede ser lo que determina la susceptibilidad de alguno entre organismos aparentemente iguales (Garcia-Repetto *et al.* 1997; Garcia *et al.*, 2003).

Los contaminantes pueden ocasionar daños letales en los individuos y resultar en el aumento de las tasas de mortalidad en las poblaciones o en al menos una etapa de vida de los individuos. Alternativamente, concentraciones subletales no suelen actuar directamente en el tamaño poblacional pero pueden ocasionar daños en diferentes niveles del organismo: daño celular, fisiológico, metabólico y reproductivo (Walker *et al.*, 1996). Un ejemplo de esto son las alteraciones observadas en el pez *Corydoras paleatus*, expuesto a concentraciones subletales de MeP. Se han observado alteraciones como: edemas, hiperplasia epitelial y reducción de la capacidad respiratoria en branquias; estagnación de la bilis, necrosis y vacuolización de regiones del hígado, así como otras alteraciones en los intestinos y en el metabolismo (Fanta *et al.*, 2003).

Los efectos de la contaminación en la conducta de los animales pueden darse de las más diversas formas usualmente ocasionados por disturbios en el SNP y SNC. Se han realizado estudios de perturbaciones en el forrajeo, apetito, agresión, cortejo sexual, efectividad de fuga y de captura, vigilancia y aprendizaje y en relaciones presa-depredador por cambios demográficos en las poblaciones (Welsh & Hanselka, 1972; Walker *et al.*, 1996; Sarma *et al.*, 2001; Gama-Flores, 1999).

Las consecuencias demográficas de la exposición a contaminantes pueden hacerse evidentes después de largos períodos de tiempo incluso en generaciones posteriores a la exposición (Walker et al., 1996). Las tasas de crecimiento poblacional pueden disminuir o inclusive volverse negativas donde el tamaño de la población decrece (Walker et al., 1996). Los efectos de los contaminantes pueden extenderse a las comunidades y a los ecosistemas. Pueden perturbar las interacciones del suelo, ocasionar acidificación en ríos y lagos, y eventualmente afectar la composición de la atmósfera, dispersarse por el planeta y causar diversos daños (Walker et al., 1996).

### **1.3 La problemática: El pez y el plaguicida**

Estudios sobre los efectos de contaminantes en organismos dulceacuícolas han sido frecuentes. Se ha confirmado el efecto tóxico de la exposición a organofosforados por la inhibición de la actividad catalítica de la AChE en el pez *Danio rerio*, comúnmente conocido como pez zebra, en el pez *Chirostoma riojai*, en *Beta splendens* y *Corydoras paleatus*, así como en organismos plantónicos como: dinoflagelados, copépodos, euglenas y cladóceros (Weiss, 1961; Welsh & Hanselka, 1972; Roex et al., 2002; Favari et al., 2002; Fanta et al., 2003).

Se han registrado concentraciones del contaminante MeP en regiones que coinciden con algunas localidades de la distribución de *G. multiradiatus* (De La Vega Salazar et al., 1997). Las concentraciones encontradas varían por localidad y son diferentes de acuerdo a la estación de sequía o de lluvia, menores y mayores, respectivamente (Arellano-Aguilar & Macías Garcia, 2009; ver 4.4).

En el pez *G. multiradiatus* también se han observados efectos de la exposición al contaminante organofosforado MeP. Se ha observado que cuando hembras de *G. multiradiatus* adultas y embarazadas son expuestas a concentraciones subletales de 0.005 µg por gramo de alimento, sus crías llegan a bioacumular el MeP casi diez veces más (De la Vega Salazar, 1997). Las consecuencias son: variaciones en su desarrollo

embrionario, en la ontogénesis y diversos efectos teratológicos como malformaciones morfológicas en la columna vertical del tipo: xifosis, escoliosis o lordosis (Arellano-Aguilar & Macías Garcia, 2009). Esto es debido a que los embriones bioacumulan el MeP hasta siete veces más que los adultos debido a que no pueden metabolizar el compuesto antes de su madurez (Arellano-Aguilar & Macías Garcia, 2008).

También se observó que los machos adultos que fueron expuestos al MeP cuando embriones, presentan tallas y aletas más pequeñas, disminución en los índices de saturación de color en sus aletas, además de modificaciones en el despliegue de cortejo, comparados con machos no expuestos (Arellano-Aguilar & Macías Garcia, 2008).

Los estudios a nivel de organismo se han enfocado en la detección de los efectos letales de los contaminantes. Los mecanismos de acción de los plaguicidas y sus efectos letales son bastante conocidos. A pesar de ello, hay poca información sobre los efectos acumulados de concentraciones subletales de contaminantes. Lo anterior sugiere la necesidad de caracterizar, cuantificar y evaluar los posibles efectos de la exposición a concentraciones subletal de los plaguicidas, a nivel individual, poblacional y sus implicaciones ecológicas a lo largo de las generaciones en el pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus*.

En este trabajo se estudiaron las alteraciones en estos parámetros en *G. multiradiatus* frente a la exposición de concentraciones subletales de contaminante organofosforado Metil Paratión (MeP). En particular, se evaluó si la exposición al MeP afecta características morfológicas, la selección sexual y parámetros demográficos como natalidad, mortalidad, fecundidad y tasas de crecimiento poblacional, entre otros. Para esto se compararon las variables entre individuos del grupo control y del grupo experimental por tres generaciones.

## **2. OBJETIVOS**

Evaluar los efectos, a nivel individual y poblacional, de la exposición de poblaciones artificiales del pez amarillo *G. multiradiatus* a concentraciones subletales de 0.005 µg del plaguicida metil paratión (MeP). Esto fue hecho por medio de la comparación de estas poblaciones con un grupo control (no expuesto al MeP) en los siguientes parámetros:

- Morfología: tallas corporales y coloración (capítulo primero).
- Selección Intersexual: preferencia de la hembra (capítulo segundo).
- Demografía: parámetros demográficos como: natalidad, mortalidad, frecuencia de malformaciones, fecundidad, proporción sexual, y proyecciones poblacionales (capítulo tercero y cuarto).

## **3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES**

La hipótesis general es que si poblaciones artificiales de *G. multiradiatus* son expuestas a concentraciones subletales de 0.005 µg/g del plaguicida Metil Paratión, presentarán efectos negativos en sus propiedades biológicas a nivel individual (morfología y conducta) y poblacional (parámetros demográficos).

Se espera que los individuos expuestos al MeP presenten perturbaciones en parámetros morfológicos como reducción en la talla corporal y coloración más opaca. En caso afirmativo, se espera que por eso las hembras sean capaces de discernir entre los machos y mostrar preferencia por machos no expuestos al MeP. Además, si la preferencia de las hembras refleja la tasa reproductiva, es decir, que la preferencia de la hembra por un macho resulte en una efectiva reproducción con este macho, se espera que el grupo de los machos no expuestos al MeP presente mayor tasa de crecimiento poblacional en las generaciones subsecuentes. Por último, se espera que un decremento en la tasa reproductiva ocasionado por la exposición al MeP disminuya el tamaño de las poblaciones expuestas a lo largo de las generaciones.

## **4. MÉTODOS GENERALES**

Para evaluar los efectos y las consecuencias de la exposición a concentraciones subletales del insecticida metil paratión- MeP, se realizó un experimento donde individuos de *G. multiradiatus* fueron expuestos al contaminante. Los efectos fueron comparados entre el grupo control de individuos no expuestos al MeP y el grupo experimental de individuos expuestos a concentraciones subletales de MeP. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera:

### **4.1 Colecta, Mantenimiento y Tratamiento de los peces**

En abril de 2007 fueron colectadas 40 hembras preñadas de *G. multiradiatus* de la presa Salazar (ver 1.1.2.). Las hembras fueron separadas individualmente en bolsas plásticas para ser transportadas al laboratorio. Se preparó cada bolsa con un tercio de agua, dos tercios de aire, tres gotas de antiestrés (Stress Coat®), para proteger la mucosa de la superficie corporal de los peces y compuestos de zeolita, que absorben los desechos de urea excretados por los peces. En el laboratorio se instalaron dos hembras por pecera de 40 L después de un periodo de  $30 \pm 10$  min para aclimatación. El laboratorio proporciona condiciones estandarizadas de temperatura ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y un fotoperiodo de 12 h/12 h (luz/oscuridad) para todas las peceras durante todo el año. Los peces fueron alimentados diariamente con hojuelas comerciales (Sera Vipán®) dos veces al día.

Las hembras colectadas formaron la generación parental (P), por lo que las siguientes generaciones fueron sucesivamente F1, F2, F3, F4 y F5 (ver Fig. 4.1). Las hembras P colectadas en el campo no fueron contempladas en los análisis del estudio con el objetivo de evitar variables no controlables de su historia de vida (i.e. edad, madurez, fecundidad, cantidad de gestaciones, etc). Por lo tanto, en este estudio se toman en cuenta resultados obtenidos a partir de la generación F1.

Las hembras P a punto de parir fueron transportadas a maternidades individuales donde fueron observadas diariamente hasta el parto (ver detalles en 7.4). Después del parto de todas las hembras P, las crías supervivientes fueron distribuidas equitativamente en nueve peceras de 240 L (D1 a D9) buscado igualar la talla y la proporción sexual de los individuos entre peceras. Para esto, la distribución fue realizada aproximadamente 40 días después del nacimiento de las crías F1, cuando ya fue posible distinguir el sexo de todos los individuos.

Los individuos de F1 fueron separados en dos grupos, el grupo control y el experimental. El grupo control fue distribuido en tres peceras (D1, D2, y D3) y el experimental en seis (D4 a D9). Esto generó diferencia en el número de individuos de los grupos en todas las generaciones.

Al momento en que se observó la primera hembra preñada en F1 se dio inicio al tratamiento. El grupo control fue alimentado con hojuelas no contaminadas mientras que el experimental fue alimentado con concentraciones de 0.0005  $\mu\text{g}$  de MeP por gramo de alimento (ver apartado 4.3.). La duración de este tratamiento se dio hasta que no hubiera ninguna hembra F1 preñada, es decir, hasta que nacieron todas las crías F2. Esto equivale a aproximadamente 40 días con una varianza de hasta  $\pm 15$  días, sin embargo, no se observaron diferencias debido a esta discrepancia. La administración del alimento contaminado al grupo experimental fue retomada al observar la primera hembra preñada de la generación F2 y nuevamente prolongada hasta el completo parto de las crías F3. Lo mismo se hizo hasta la generación F4. El intervalo de tiempo intergeneracional fue de  $150 \pm 30$  días.

En cada generación las crías fueron separadas de los individuos adultos con el propósito de obtener poblaciones formadas solamente con la nueva generación, es decir, fueron separadas por cohortes. Por ejemplo, las crías nacidas de las hembras colectadas P fueron separadas de sus progenitores y consideradas generación F1, las crías nacidas de F1 también fueron separadas y consideradas F2 y así sucesivamente.

Las hembras F1 controles tuvieron aproximadamente 80 crías F2 y las del grupo experimental 160 crías F2. Después de separadas de los adultos, las crías

descendientes del grupo control fueron distribuidas equitativamente entre las tres peceras del grupo control y las del experimental entre las seis peceras del grupo experimental. Las crías de un tratamiento siempre son descendientes de madres del mismo tratamiento, es decir, crías no expuestas descienden de madres no expuestas y crías contaminadas de madres contaminadas, en todas las generaciones.

La distribución de las crías en las peceras de sus respectivos grupos fue hecha de manera azarosa en todas las generaciones. Este procedimiento imposibilita la identificación de individuos pero disminuye el efecto de la endogamia, de la deriva génica y de apareamientos concordantes (Lande, 1984).

Después de nacidas todas las crías, los procedimientos se repiten en el mismo orden: las crías nacieron y fueron separadas de los adultos, después fueron distribuidas en peceras de sus respectivos tratamientos. Al momento en que se observó la primera hembra preñada de la generación se retomó el tratamiento. La duración del tratamiento se dio hasta que nacieron todas las crías. Las crías fueron otra vez separadas de los adultos, distribuidas en sus respectivas peceras y así sucesivamente (ver Fig. 4.1; ver Tabla de números de individuos por tratamiento de todas las generaciones en apartado 7.5).

Cabe resaltar que hay diferencias en el método entre las generaciones F1, F2, F3 y F4. A diferencia de la distribución de las crías F1 entre las nueve peceras, las de F2 y F3 fueron distribuidas entre las peceras de sus respectivos grupos (control o experimental). Las crías de F4 descendientes del grupo control fueron reagrupadas en una pecera no contaminada (D2) y las descendientes del grupo experimental en una pecera expuesta al MeP (D9). El reagrupamiento fue hecho por el bajo número de crías sobrevivientes en esta generación. Sin embargo, la principal diferencia entre generaciones es que los individuos experimentales de F1 solamente fueron expuestos al contaminante después de adultos mientras que los individuos de F2, F3 y F4 fueron expuestos al MeP desde su desarrollo embrionario (ver Fig. 4.1.).

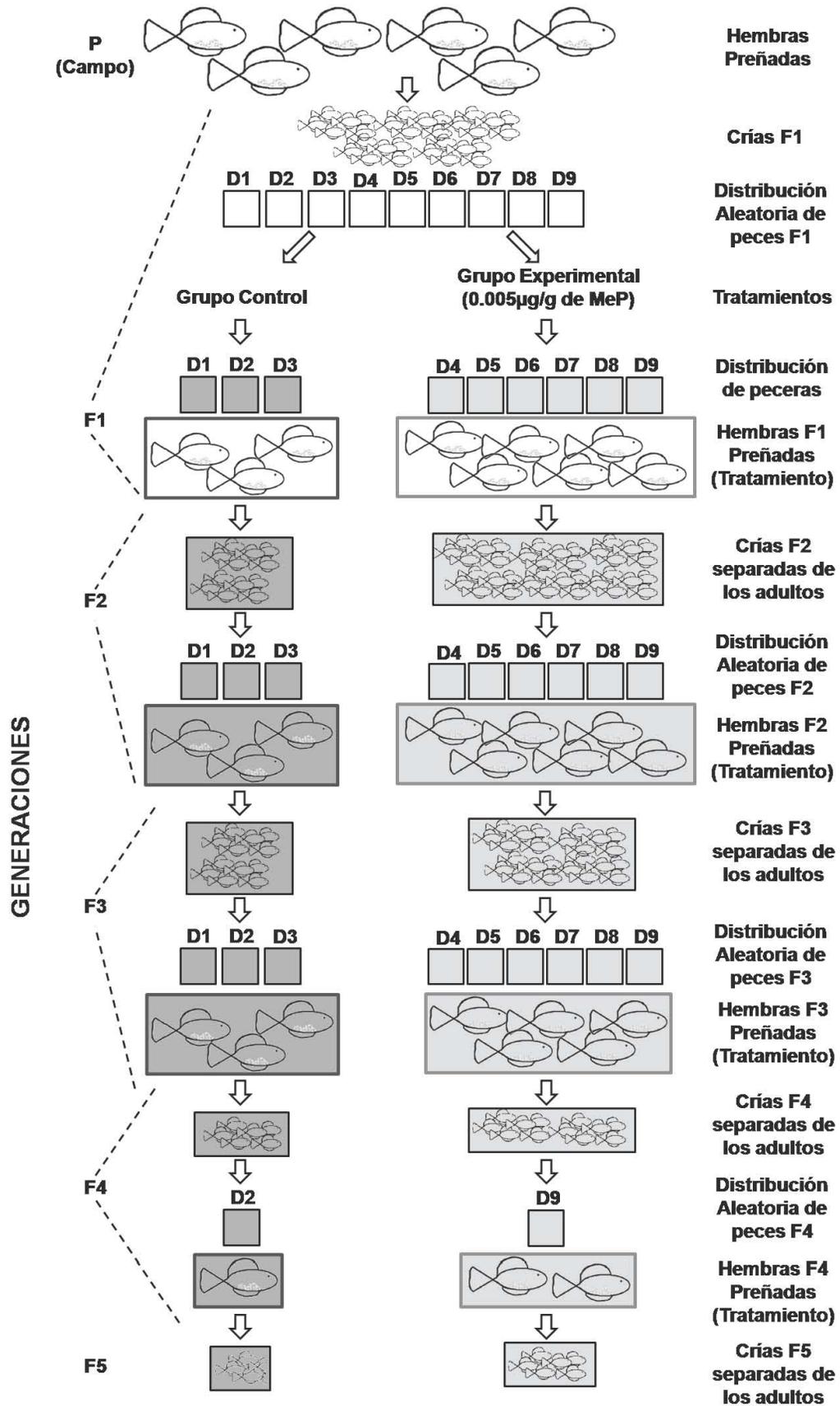


Fig. 4.1. Esquema ilustrativo del método utilizado. Las hembras preñadas colectadas fueron consideradas la generación P, y no fueron contempladas en este estudio. Cuando hubo hembras preñadas en la generación F1, los individuos fueron separados en dos grupos (control y experimental). Al grupo experimental se le administró una concentración de 0.005  $\mu\text{g/g}$  de MeP en el alimento. Los individuos F1 solo fueron expuestos al MeP en edad adulta cuando se observaron hembras preñadas. A partir de F2, fueron expuestos al contaminante durante su desarrollo embrionario y nuevamente cuando las hembras F2 se observaron preñadas. Después de nacidos, los críos fueron separados de los adultos. Las generaciones subsecuentes se expusieron al mismo método.

#### **4.2 Preparación del alimento contaminado**

El grupo experimental fue expuesto al contaminante organofosforado metil paratión-MeP vía ingesta de alimento de acuerdo con el protocolo anteriormente reportado en Arellano-Aguillar & Macías-García (2008). En la preparación del alimento contaminado se utilizó metil paratión-MeP (TECROM, Ciudad de México, México) adquirido en estado sólido (polvo) con una pureza de 99.4%. Para lograr la incorporación del MeP en las hojuelas de alimento comercial Seravipan® fue necesario hacer su dilución en el solvente acetonitrilo (TECSIQUIM, México). Se utilizó equipo específico de protección durante la administración del contaminante.

Dos concentraciones distintas del contaminante fueron suministradas al grupo experimental. Durante el primer mes del tratamiento se administró una concentración de 0.5  $\mu\text{g}$  de metil paratión por gramo de alimento únicamente a la generación F1. Para obtener esta concentración, 25 ml de una solución de acetonitrilo con 1  $\mu\text{g}$  de MeP fue usada para impregnar 50 g de hojuelas de alimento. Posteriormente se disminuyó la presión de selección administrando una menor concentración de 0.005  $\mu\text{g}$  de metil paratión por gramo de alimento. Para esta nueva concentración, 25 ml de una solución de acetonitrilo con 0.01  $\mu\text{g}$  de MeP fue disuelta en 50 g de hojuelas de alimento. Una vez incorporadas las soluciones en las hojuelas se esperó la completa evaporación del acetonitrilo por cerca de tres horas antes de almacenar el alimento en la oscuridad en un refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La comida del grupo control se preparó agregando la misma cantidad de acetonitrilo pero sin el contaminante MeP. La cantidad de alimento preparada en cada generación fue variable debido al consumo desigual por el diferente número de individuos.

La concentración utilizada también fue elegida con base en los resultados de Arellano-Aguilar & Macías-García (2008) quienes observaron efectos no letales del MeP en los individuos. En ese trabajo, suministrar la concentración de 0.005 µg/g MeP no afectó la condición de las hembras preñadas pero provocó malformaciones teratológicas en los descendientes y alteraciones morfológicas en los adultos sobrevivientes, como tallas reducidas. Además los machos adultos que fueron expuestos a estas concentraciones durante su desarrollo embrionario presentaron menor saturación de color en las aletas ornamentadas y peor desempeño sexual que los machos del grupo control. Otra razón para el uso de esta concentración se debe al hecho de que es similar o menor que el promedio de las concentraciones de MeP encontradas en el agua de presas donde también habita *G. multiradiatus* como en San Juanico (0,0036 µg/ml) e Ignacio Ramírez (0.0005 µg/ml) también en la región central de México (De La Vega Salazar *et al.*, 1997; Arellano-Aguilar, 2008; ver Fig. 1.2).

### **4.3 Localidad de colecta**

La presa de Salazar está ubicada en el km 36 del lado oeste de la carretera México-Toluca, (N 19°18.33', W 99°23.35'), tiene una extensión aproximada de 0.11 km<sup>2</sup> y se encuentra a una altitud de 2990 msnm. Está formada por un afluente del río Lerma y se encuentra en la región sureste de la cuenca del Alto Lerma, en la cuenca Lerma-Chapala en la región Central de México (ver Fig.1.2).

La presa de Salazar se encuentra en una zona constantemente deteriorada. El área alrededor de la presa tiene actualmente menos de 5% de la vegetación natural. Es una zona muy visitada por paseantes, principalmente los fines de semana, lo que genera una enorme cantidad de basura. Las áreas circundantes a la presa son deforestadas con el propósito de implementar cultivos como maíz, frijol y algodón, lo que ocasiona la desecación de los cuerpos de agua, tanto superficiales como subterráneos. Otro problema que enfrenta la presa es la contaminación por desechos químicos como insecticidas y plaguicidas que son utilizados en estos cultivos (Guzmán *et al.*, 1995; INEGI, 2003; CONABIO, 2005).

En Febrero de 2005, Arellano-Aguilar & Macías Garcia (2009) midieron los niveles del plaguicida MeP en la superficie del agua de la presa Salazar y encontraron concentraciones de  $0.037 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$  (promedio  $\pm$  e.e.). Esta medición se hizo en la época de sequía cuando los niveles de actividad agrícola son bajos, y por lo tanto también el uso de insecticidas. Además, coincide con el inicio de la temporada reproductiva de *G. multiradiatus*, lo que conlleva a creer que las concentraciones encontradas son comparables y similares a las utilizadas en este estudio (ver detalles en Arellano-Aguillar & Macías Garcia, 2009).

## Capítulo primero

**5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE*****Girardinichthys multiradiatus***

El efecto de la selección sexual en peces puede ser estudiado en función de diferentes variables. Los dos grupos de atributos morfológicos importantes en la selección sexual en *Girardinichthys multiradiatus* son la talla corporal y la coloración (ver 6.2.2). Este capítulo se dedica separadamente a cada uno de ellos.

**5.1. TALLA CORPORAL**

La talla corporal es un factor importante en la selección sexual de la mayoría de los grupos de animales. La talla corporal de los machos o la talla de sus ornamentos, son un atractivo determinante en la selección sexual (Bischoff et al, 1985; Morris & Ryan, 1995; Rosenthal et al, 1996; ver 6.1). Los ornamentos sexuales o caracteres conspicuos de los machos son los principales componentes morfológicos determinantes de la elección de pareja por parte de las hembras. Las hembras de varios grupos de animales discriminan y demuestran preferencia por machos que presentan el ornamento más complejo, más conspicuo o más llamativo. Los machos con ornamento suelen tener un mayor éxito reproductivo y como la mayoría de rasgos sexuales tiene un componente genético, éste será heredado a lo largo de las generaciones, lo que ocasionará una exageración del rasgo (ver 6.2.1; Bischoff et al., 1985; Morris & Ryan, 1995; Rodd & Sokolowsky; 1995).

La ornamentación de los machos muchas veces consta de un componente morfológico que también es responsable por el dimorfismo sexual entre machos y hembras. En el pez guppy la aleta caudal es el principal ornamento de los machos y por

ende su rasgo dimórfico. En pruebas de elección de pareja se observó que las hembras siempre demuestran preferencia por el macho con la aleta caudal de mayor tamaño (ver 1.1.4.; Rodd & Sokolowsky, 1995). Como mencionado anteriormente, los ornamentos sexuales de los machos de *G. multiradiatus* son sus aletas dorsales y ventrales que son grandes y coloridas en comparación con las aletas de las hembras (ver 1.1.1.; Macías Garcia, 1994, 1998).

Las hembras también fueron evaluadas en este estudio. El tamaño corporal de la hembra es considerado durante la elección de pareja. La talla puede ser un indicativo de calidad y de la fecundidad de la hembra. Hembras grandes son muchas veces preferidas porque su capacidad reproductiva es dependiente de su talla corporal, es decir, hembras grandes tienen la capacidad de producir una mayor cantidad de prole que hembras pequeñas. De este modo, la reproducción con hembras de mayor tamaño puede indicar una mayor adecuación (Rodd & Sokolowsky, 1995; Morris & Ryan, 1995). Por ello, también se evaluaron los efectos del plaguicida MeP en la talla corporal de las hembras. Se comparó la talla corporal y la talla de las aletas de hembras del grupo control y del grupo experimental por tres generaciones.

Los efectos de la exposición de plaguicidas en la morfología de peces han sido estudiados en una variedad de organismos. En este trabajo se evaluaron las alteraciones en la talla corporal y en los ornamentos de *G. multiradiatus* frente a la exposición de contaminantes en el medio acuático. En particular, se evaluó la posibilidad de que la exposición al metil paratión-MeP reduzca la talla corporal de machos y hembras y la talla de aletas en machos expuestos al contaminante. Para esto se comparó la talla corporal y la talla de las aletas de machos del grupo control y del grupo experimental por tres generaciones.

### **5.1.1. Objetivos**

Determinar los posibles efectos del MeP en la talla corporal entre machos y hembras del grupo experimental de *G. multiradiatus* expuesto a concentraciones subletales de 0.005 µg de MeP durante tres generaciones. Comparar los siguientes parámetros de talla corporal entre el grupo control y el experimental:

- Longitud estándar y altura corporal (ver Fig. 5.1.1, medidas 1 y 2).
- Tamaño de las aletas dorsales, ventrales y caudales (ver Fig. 5.1.1, medidas 3, 4, 5, 6, C y D).
- Dimensiones del ojo (ver Fig. 5.1.1, medidas A y B).
- Diferencias en la talla corporal entre machos y hembras y entre cada generación.

### **5.1.2. Hipótesis y predicciones**

Si la talla corporal es afectada por la exposición al MeP, los individuos del grupo experimental expuestos al contaminante deberán presentar una menor longitud y altura, y menores aletas dorsales, ventrales y caudales que los del grupo control. Esto debe ser observado en machos y hembras. Sin embargo, se espera que el efecto en las aletas sea mayor en machos debido a que se tratan de ornamentos sexuales.

### **5.1.3. Métodos**

Las medidas corporales de los peces fueron tomadas utilizando el mismo método que González Zuarth & Macías Garcia (2006) y que Arellano-Aguillar & Macías Garcia (2008), para tener resultados comparables a los suyos. Los peces fueron anestesiados utilizando 10 gotas de una mezcla de 1 g de benzocaina en 100 ml de acetona diluidas en 200 ml de agua (Gilderhus, 1990; Webb et al., 2004). Los peces solamente fueron manipulados después de que el anestésico surtió efecto. Todos los individuos fueron posteriormente identificados (generación, pecera de origen (tratamiento), sexo y número individual) y conservados en un congelador.

Las mediciones se dividieron en dos grupos: medidas obtenidas directa e indirectamente. Las medidas obtenidas directamente fueron la masa y talla corporal, considerada ésta como la longitud estándar (LE). La masa fue obtenida con una balanza marca Ohaus, modelo Scout SC2020 (precisión de  $200 \times 0.01$  g) y la longitud estándar con un vernier electrónico marca Mitutoyo (schok proof, precisión de 0.05 mm).

Las medidas indirectas se obtuvieron por medio de dos fotografías que se tomaron a cada individuo. Una cámara digital fue colocada sobre un tripie y posicionada sobre una superficie plana con rejilla métrica y condiciones de luz constantes. Los peces fueron colocados sobre la plataforma para que las fotografías fueran tomadas. Las fotografías fueron analizadas con la ayuda del programa de computación Image Tool Versión 8.0, el cual se calibra con la rejilla métrica en la foto para obtener las medidas de interés. Se utilizó el mismo protocolo que González Zuarth & Macías Garcia (2006) y Arellano-Aguilar & Macías Garcia (2008) en el cual se determinan diez medidas corporales, seis en regiones del cuerpo directamente relacionadas con la selección intersexual de hembras y machos (representadas en la Fig. 5.1.1. por números de 1 a 6) y cuatro no directamente relacionadas (representadas en la Fig. 5.1.1. por letras de A a D), que reflejan variación fenotípica no relacionada a la selección sexual. Los dos valores obtenidos para cada medida, uno de cada foto, fueron promediados para que solamente hubiera un valor para cada medida (i.e. promedio de las dos medidas, de la foto 1 y de la foto 2, de la variable 1; ver detalles en ACP).

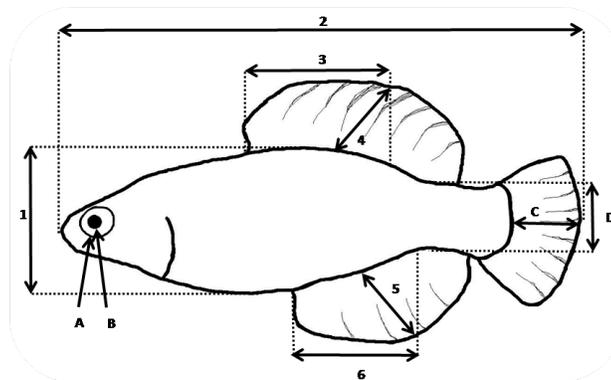


Fig. 5.1.1. Medidas de tallas corporales tomadas.

Debido al elevado número de variables se hizo un análisis de componentes principales (ACP). El ACP es un análisis multivariado cuyo objetivo es sintetizar el número original de variables por medio de una combinación lineal, lo que resulta en una reducción de la dimensionalidad de los datos, es decir, el ACP te proporciona una o dos variables derivadas de las variables originales. Donde antes se utilizaban N variables para categorizar un individuo, ahora un número X ( $<N$ ) de variables es suficiente. Estas nuevas variables retienen las principales características del conjunto de datos que contribuyen más con su varianza y por eso son denominadas componentes principales (CP). Para considerar el ACP se deben cumplir algunas condiciones: 1) que los CP presenten elevados valores de varianza (principalmente el primer CP), es decir que el porcentaje de la varianza explicada por cada factor sea elevado (se considera que el CP1 debe explicar un mínimo de 40% de la varianza), 2) que la suma de la varianza explicada por todos los CPs resultantes sea elevada (alrededor de 90%), y 3) el valor propio (o valor eigen) sea mayor que uno ( $e > 1$ ). El valor propio es un vector lineal que no resulta afectado durante la transformación de variables cuando presenta valor mayor a la unidad (Pearson, 1901; Dunteman, 1989).

Se sacaron los promedios de los valores obtenidos para cada medida para que en el ACP se pudiera observar claramente la medida de peso o de mayor influencia en la varianza de los ACPs. Las diez medidas de talla corporal del pez utilizadas como variables de entrada en el ACP fueron (ver Fig. 5.1.1): 1- Altura del pez; 2- Longitud Estándar del pez; 3- Largo de aleta dorsal; 4- Altura de aleta dorsal; 5- Altura de aleta ventral; 6- Largo de aleta ventral; A- Diámetro del ojo; B- Diámetro de la pupila; C- Largo de aleta caudal y D- Altura de pedúnculo.

Para saber si los CPs 1 y 2 presentaban diferencias entre generaciones y principalmente poder comparar los efectos del tratamiento en la talla corporal de los peces, fue necesario hacer un análisis comparativo. Los datos presentaron distribución normal (Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ ) por lo que se hizo un análisis de varianza-ANOVA. Los individuos fueron separados de acuerdo a su generación y tratamiento. Además, las tallas corporales de machos y hembras fueron analizadas separadamente debido al dimorfismo sexual marcado. En el ANOVA fueron considerando como factores

independientes: 1.Generación, 2.Sexo, 3.Tratamiento y las interacciones 1-2, 1-3, 2-3 y 1-2-3 para cada uno de los CP obtenidos.

Los análisis de ACP y de ANOVA fueron hechos con el programa computacional SPSS versión 15.

#### **5.1.4. Resultados**

El ACP dio como resultado dos componentes principales que explican las diferencias en la talla corporal por generación (CP1) y el dimorfismo sexual de machos y hembras (CP2). CP1 explicó el 74.18% de la varianza y CP2 el 20.84%, juntos explican el 95.02% de la varianza morfológica en nuestro experimento. Los dos componentes CP1 y CP2 tuvieron un valor propio  $e>1$  y fueron utilizados para los análisis comparativos posteriores (ver Tabla 5.1.1. y Fig. 5.1.2.).

Tabla 5.1.1. Componentes resultantes del Análisis de Componentes Principales-ACP de la talla corporal.

	CP 1	CP 2
%	74.18	20.84
% Acumulado	74.18	95.02
Valor Propio	30.73	8.64

Los pesos que las variables tienen en cada uno de los CP se puede observar en la tabla a continuación (ver Tabla 5.1.2). Se puede observar que la longitud estándar del pez tuvo el mayor peso en el CP1 (0.94), lo que refleja que el CP1 representa la talla corporal de los peces. Las medidas que tuvieron mayor peso en el CP2 fueron el largo y la altura de la aleta dorsal, reflejando la forma o dimorfismo sexual de los peces (ver Fig. 5.1.2).

Tabla 5.1.2. Pesos o cargas de las variables de talla corporal en CP1 y CP2.

Variables (ver Fig. 5.1.1)	CP1	CP2
1- Altura del pez	0.29	-0.04
2- Longitud Estándar del pez	0.94	0.13
3- Largo de aleta dorsal	-0.04	0.55
4- Altura de aleta dorsal	-0.06	0.47
5- Altura de aleta ventral	-0.06	0.04
6- Largo de aleta ventral	-0.07	0.05
A- Diámetro del ojo	0.02	0.01
B- Diámetro de la pupila	0.01	0.01
C- Largo de aleta caudal	0.06	0.04
D- Altura de pedúnculo	0.14	-0.02

La representación del ACP se puede observar en la Fig. 5.1.2. Los componentes separan a machos y hembras y cada una de las generaciones. El CP1 refleja la talla corporal de los peces. El CP2 refleja las diferentes formas corporales entre los peces, es decir, el dimorfismo sexual entre machos y hembras. Se observa que los machos son significativamente más pequeños que las hembras, patrón esperado en peces vivíparos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellos debido al tratamiento en F1, F2 o F3, se presume que la disminución en su talla corporal entre generaciones fue debida a efecto cautiverio y no a la exposición al contaminante. En hembras tampoco hubo diferencias significativas en su talla corporal por el tratamiento, en las generaciones F1 y F3. No obstante, se encontraron diferencias significativas por el tratamiento en la generación F2. Las hembras del grupo expuesto al MeP presentaron talla corporal significativamente menor que las del grupo control. También se observan diferencias en la talla corporal entre la generación F1 y F3 en ambos sexos, pero sin diferencias por el tratamiento.

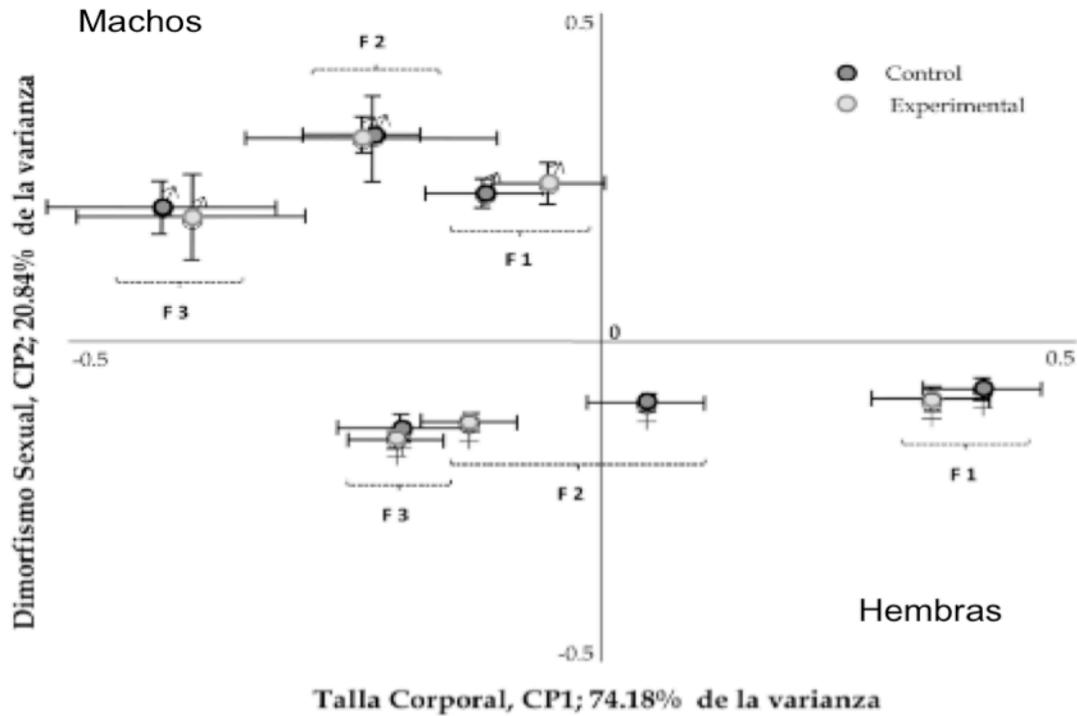


Fig. 5.1.2. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la talla corporal. El primer componente principal (CP1) refleja las diferencias en la talla corporal mientras que el segundo componente (CP2) refleja el dimorfismo sexual. Se observó una disminución en la talla a lo largo de las generaciones en machos y hembras. La disminución fue significativa en las hembras en la segunda generación.

Las matrices de correlaciones entre las variables de entrada en el ACP pueden ser observadas en la Tabla 11.1 (Anexos). Se observan las correlaciones positivas entre las medidas que reflejan talla corporal como: altura del pez y longitud estándar, y las correlaciones negativas con las medidas que reflejan el dimorfismo sexual como: altura y largo de aletas dorsales y ventrales.

Los componentes principales obtenidos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA), que reveló diferencias significativas entre las generaciones en CP1 y diferencias entre los sexos en CP1 y CP2. El efecto de la interacción entre generación y sexo también fue significativo en ambos componentes (ver Tabla 5.1.2).

Tabla 5.1.2. Análisis varianza (ANOVA) de los componentes principales, CP1 y CP2. Los factores independientes del ANOVA fueron: 1.Generación, 2.Tratamiento y 3.Sexo. También fueron analizadas las interacciones entre los factores, 1-2, 1-3, 2-3 y entre los tres simultáneamente, 1-2-3. Se encontraron diferencias significativas en 1 en CP1 y en 3 y 1-3 en CP1 y CP2.

	CP1		CP2	
	F	P	F	p
1-Generación <sup>a</sup>	53.82	< <b>0.001</b>	5.22	<b>0.006</b>
2- Tratamiento <sup>b</sup>	0.19	0.666	0.55	0.460
3-Sexo <sup>b</sup>	48.23	< <b>0.001</b>	526.08	< <b>0.001</b>
1-2	0.42	0.660	0.08	0.926
1-3	5.33	< <b>0.001</b>	3.38	< <b>0.05</b>
2-3	1.09	0.298	0.92	0.337
1-2-3	0.13	0.878	0.74	0.928

a= g.l.; 1,2; b= g.l.; 1,219.

Debido a que las diferencias significativas encontradas están combinadas entre factores, se aplicó un ANOVA separadamente para machos y hembras. El propósito fue evaluar detalladamente la talla corporal en cada uno de los sexos y poder observar si hay diferencias en cada género debido al tratamiento. Los factores independientes fueron: generación y tratamiento, y los independientes: CP1, cuerpo, aletas, ojos y cola. Los machos mantuvieron las diferencias entre generaciones en CP1, pero además presentaron diferencias significativas en la longitud del cuerpo, aletas y cola. Para las hembras se encontraron resultados similares con la excepción de que ellas no presentaron diferencias significativas en la longitud de sus aletas. No se encontraron diferencias significativas en la talla de los ojos en ninguno de los sexos en ninguna generación (ver Tabla 5.1.3). Además, se hizo un discriminante del ACP separadamente para machos y hembras para identificar diferencias entre las variables significativas para cada sexo (ver Tabla 11.2 en Anexos).

Tabla 5.1.3. Análisis de ANOVA de los Componentes Principales (ACP) en machos y hembras separadamente. Factores independientes: generación y tratamiento. Factores dependientes: CP1, Cuerpo, Aletas, Ojos y Cola.

Machos	CP 1		CUERPO		ALETAS		OJOS		COLA	
	F	P	F	p	F	p	F	p	F	P
1- Gen <sup>a</sup>	9.05	< <b>0.001</b>	6.77	< <b>0.005</b>	20.03	<b>0.000</b>	2.80	0.11	17.62	< <b>0.001</b>
2- Trat <sup>b</sup>	0.14	0.71	0.39	0.53	0.30	0.59	1.30	0.26	0.15	0.70
1-2	0.86	0.92	1.23	0.30	2.82	0.67	0.24	0.78	0.19	0.83

Hembras	CP 1		CUERPO		ALETAS		OJOS		COLA	
	F	P	F	p	F	p	F	p	F	P
1- Gen <sup>a</sup>	57.05	<b>0.000</b>	26.80	<b>0.000</b>	2.98	0.53	0.24	0.78	35.14	<b>0.000</b>
2- Trat <sup>c</sup>	1.54	0.22	2.52	0.11	2.80	0.10	0.48	0.49	0.18	0.68
1-2	0.58	0.56	1.20	0.30	0.60	0.55	0.14	0.87	2.28	0.10

a= g.l.;1,2. b= g.l.;1,75. c= g.l.; 1,143

### 5.1.5. Conclusiones

El contaminante MeP es neurotóxico y puede afectar el desarrollo de los peces (De La Vega Salazar *et al.*, 1997, Arellano-Aguilar, 2008, ver en 1.2.1.), por lo que es factible que su morfología y su talla corporal sea afectada. No obstante, los machos de *G. multiradiatus* no presentaron ninguna diferencia significativa entre los grupos control y experimental atribuibles al tratamiento. La disminución de la talla corporal observada en machos parece ser debida al cautiverio y no a la exposición al plaguicida.

Las hembras no demostraron diferencia significativa debida al tratamiento ni en la primera ni en la tercera generaciones. En la segunda generación las hembras expuestas al plaguicida presentaron talla corporal significativamente reducida comparadas con las hembras controles (ver Fig. 5.1.2.).

En los análisis hechos considerando separadamente machos y hembras tampoco se encontraron resultados significativos debido al tratamiento. El ANOVA y los discriminantes nos corroboran las diferencias marcadas del dimorfismo sexual en las aletas de machos y hembras.

Cabe recordar que la diferencia entre F1 y F2 es que los individuos de F1 solamente fueron expuestos al contaminante cuando adultos mientras que los individuos de la segunda generación también fueron expuestos cuando eran embriones. Esto quizá explica el por qué los individuos del grupo experimental de la generación F2 tuvieron mayores daños durante su desarrollo embrionario como consecuencia de la exposición temprana al MeP, y que estos daños se reflejaron en la adultez.

Sin embargo, no explica porque los efectos no fueron observados en la generación F3 donde los individuos también fueron expuestos al MeP cuando eran embriones. No quiere decir que no hubo efectos, pero pueden no haber sido notorios. Esta generación presentó una reducción elevada en la cantidad de individuos, en especial en los del grupo control, de este modo, los errores estándares fueron elevados para el grupo control posiblemente impidiendo que la diferencia entre los dos grupos fuera significativa.

## **5.2. COLORACIÓN**

Según el modelo de desventajas de selección sexual las señales son honestas cuando mantenerlas implica costos de producción y exhibición, por lo que la expresión de un ornamento depende en gran medida de la condición del portador y covaría con otras medidas de calidad individual (Zahavi, 1975; Hamilton & Zuk, 1982; Andersson, 1982). De esta manera, los individuos del otro sexo pueden utilizar los caracteres sexuales secundarios para evaluar la condición y calidad de parejas potenciales (Keyser & Hill, 1999; ver 6.2.1.).

Los ornamentos sexuales de los peces, normalmente las aletas dimórficas grandes y coloridas de los machos, son pigmentados por melanina y/o carotenoides. Dichos ornamentos responden de manera distinta al estrés ambiental además de tener distintos costos asociados a su producción y despliegue. Se ha propuesto que los ornamentos de carotenoides son mejores indicadores de endoparasitismo y salud general, mientras que los ornamentos de melanina son buenos indicadores de dominancia, concentraciones hormonales, habilidades de forrajeo y ectoparasitismo (Jawor & Breitwisch, 2003).

Los pigmentos que propician la coloración de los peces son compuestos que absorben una determinada longitud de onda de la luz incidente, pueden cambiar por

regulación directa de las células contenedoras de pigmentos, o de modo indirecto por una interacción de la luz con los pigmentos. Existen dos principales patrones de coloración: las coloraciones oscuras como manchas, rayas y marcas negras normalmente basadas en coloración por melanina, y la coloración más conspicua como amarillos, anaranjados y rojos, debida a la presencia de carotenos. Manchas y puntos de coloración conspicua pueden ser factores de reconocimiento visual, comunicación aposemática anti-depredación, reconocimiento de pareja y comunicación intersexual (Jawor & Breitwisch, 2003; McGraw & Ardia, 2003).

La coloración por melanina es muy común en peces. La expresión de melanina puede tener diferentes funciones: protección contra los rayos ultra-violeta, termorregulación, señalización sexual, mimetismo, señal de dominancia, entre otras. Las manchas oscuras de melanina pueden ser determinadas genéticamente o ser dependientes del ambiente. Por ejemplo, la expresión de melanina del pez *Gambusia holbrooki* es dependiente de la temperatura ambiental, y en otras ocasiones las manchas, rayas y “ojos negros” de los peces se hacen más marcados en presencia de depredadores, de individuos invasores, de hembras reproductivas, de machos en disputa territorial o disputa por hembras (De Kogel, 1997; Gorman & Nager, 2004; Ohlsson & Smith, 2002).

La coloración dependiente de carotenos es considerada como una señal honesta, es decir, una señal que refleja la condición de salud del individuo. Esto es porque los carotenos no pueden ser sintetizados *de novo* por los animales, tienen que ser adquiridos por la dieta (Mc Graw & Ardia, 2003). Además son normalmente recursos limitados en el ambiente. Por lo tanto son indicadores del acceso del individuo a cierta calidad y cantidad de pigmentos de color en la dieta y de su habilidad para incorporar fisiológicamente estos carotenoides al tegumento. Finalmente, por ser antioxidantes, los carotenos contribuyen con las funciones del sistema inmune y no son usados como pigmentos cuando los animales están enfermos, infectados o bajo estrés oxidativo. Por eso individuos con parásitos u otras alteraciones fisiológicas se enfrentan con disyuntivas en disponer de los carotenos para su coloración o para la defensa inmunológica. Debido a esto, el color tegumentario puede reflejar eventos fisiológicos

como el estado nutricional o de salud y tiene el potencial de indicar condición física actual (Hill, 2000).

Estos pigmentos pueden ser movilizados facultativamente a través del cuerpo para distintas funciones fisiológicas, ya sea como antioxidantes, como estimulantes al sistema inmune, o para la coloración de ornamentos. Dado que este tipo de señales dinámicas responden rápidamente a cambios en condición, ya sea nutricional o del sistema inmune, pueden indicar la calidad actual del individuo para la elección y evaluación de pareja (Hill, 2000; Torres & Velando, 2003).

Esta disyuntiva entre las funciones de los carotenos se ha observado en peces como *Poecilia reticulata*, *Betta splendens* y *Pundamilia nyererei*. Sin embargo, se ha observado que los machos de *Gasterosteus aculeatus* siguen manteniendo la coloración sexual conspicua en sus ornamentos a pesar de una dieta baja en carotenos. Esto indica que en la disyuntiva entre carotenos y sistema inmune, estos peces eligieron el costo de mantener los ornamentos sexuales a pesar de la susceptibilidad al estrés oxidativo, a alteraciones en conductas de apareamiento y baja inversión en la reproducción (Milinsky & Bakker, 1990; Candolin & Wong, 2008). El resultado es una baja en su adecuación.

Además, los carotenos son una señal visual en los ornamentos sexuales. Estudios han demostrado que los patrones de coloración basados en carotenos (como manchas, franjas y puntos, amarillos, rojos, anaranjados) son favorecidos por la selección intersexual (Torres & Velando, 2003). Por ejemplo, en pruebas de preferencia de las hembras en *Poecilia reticulata* se observó que las hembras prefieren a machos con coloración acentuada que tuvieron una dieta rica en carotenos, comparados con machos que tuvieron su dieta limitada (Endler, 1980; Kodrick-Brown, 1985; Houde, 1990; Houde 1997). Otro ejemplo, el pez trispinado (*Gasterosteus aculeatus*), tiene un cortejo en el cual los machos enseñan su garganta de color rojo adquirida de carotenos a las hembras, y se ha observado que las hembras también prefieren a los más rojos (Sparkes, 2008).

Otro elemento a considerar en los patrones de coloración de los peces es la reflectancia de ultravioleta-UV. Diversos peces presentan visión UV, lo que facilita en algunos casos, la percepción de su alimento. Sin embargo, también se ha observado que diversas especies de peces presentan patrones de coloración UV en el cuerpo utilizados en la comunicación social, muchas veces en la elección de pareja como importante factor en el cortejo (Losely et al., 1999). Un ejemplo de esto ocurre en los peces *Gasterosteus aculeatus* que presentan reflectancia de UV en su cuerpo y se ha observado que las hembras prefieren a machos con patrones de UV comparados a machos sin UV - un filtro con bloqueador solar fue aplicado durante las pruebas de preferencia (Rick & Bakker, 2008). Otro ejemplo ocurre en el pez guppy donde las hembras también prefieren a machos que reflejan la coloración UV (Smith et al, 2002).

Efectos en la coloración debido a la exposición de contaminantes se ha observado en diversas especies. En la rana (*Hyperolius argus*) se observó que la exposición a organoclorados ocasionó alteraciones en la coloración secundaria desarrollada como carácter sexual e indicativo de madurez sexual (Noriega & Hayes, 2000). En el pez guppy se observó que la exposición subletal a un organofosforado y a un estrógeno natural, disminuyó el área y la intensidad de las manchas de color anaranjado en los machos (Toft & Baatrup, 2001; Baatrup & Junge, 2001), lo que sugiere indagar sobre estos efectos en el pez *G. multiradiatus*. Por ello en el presente estudio se evaluaron los efectos de la exposición al contaminante MeP en la coloración del pez *G. multiradiatus*. En particular, se evaluó si la exposición al contaminante produce cambios en la coloración del cuerpo o de aletas. Se buscaron indicios de que los organismos necesitan desviar sus compuestos de pigmentación de carotenoides para utilizarlos como alternativa al metabolismo inmunológico de desintoxicación del contaminante.

### **5.2.1. Objetivos**

Determinar los posibles efectos del MeP en la coloración de machos y hembras del grupo experimental de *G. multiradiatus* expuesto a concentraciones subletales de MeP durante tres generaciones. Para ello se compararon los siguientes parámetros de coloración entre el grupo control y el experimental:

- La coloración de las aletas dorsales, ventrales y caudal.
- La coloración del cuerpo.
- La coloración entre machos y hembras.
- La coloración entre cada generación.

### **5.2.2. Hipótesis y predicciones**

Si los patrones de coloración llegan a ser afectados por la exposición al MeP, los individuos del grupo experimental expuestos al contaminante deberán presentar menor reflectancia en las coloraciones amarillo y rojo mientras que los individuos del grupo control presentarán una mayor reflectancia en UV y una menor saturación espectral total. Además, se espera que los patrones de coloración sean diferentes entre machos y hembras y que el efecto de la exposición al MeP sea más marcado en los machos del grupo experimental.

### **5.2.3. Métodos**

Para comparar la coloración de los peces del grupo control con los del grupo experimental se utilizó el mismo método que Arellano-Aguilar (2009). Después de anestesiados los peces, se midió su color en ocho puntos del cuerpo. La distribución de los puntos fue: dos en la aleta dorsal (1 y 2); dos en la aleta ventral (3 y 4); uno en la aleta caudal (5) y tres en el cuerpo (6, 7 y 8; Fig. 5.2.1.).

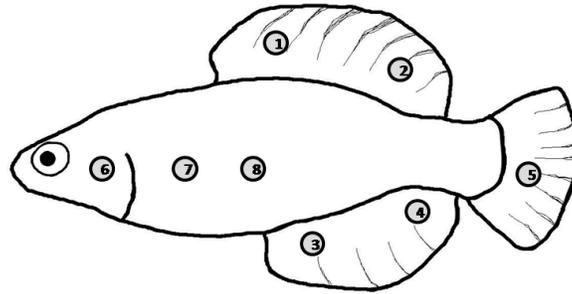


Fig. 5.2.1. Puntos del cuerpo en donde se midió la coloración de los peces.

La coloración se midió por medio de la reflectancia. La reflectancia se obtuvo por medio del espectrofotómetro Ocean Optics USB4000 que abarca el rango de longitud de onda de 200 a 1100 nm. Los valores de reflectancia de la longitud de onda ( $\lambda$ ) fueron obtenidos con el programa Spectrasuite 10.0. Se analizó la longitud de onda de 360 a 740 nm. Se calculó: a) el croma de ultra violeta UV, b) el croma amarillo, c) el croma rojo y d) la saturación espectral del croma. Para calcular a) el croma UV se usó la reflectancia de la longitud de onda entre 360-400 nm ( $C_{UV} = R_{[360-400]}/R_{[360-740]}$ ), b) la reflectancia entre 500-630 nm para el croma amarillo ( $C_{AM} = R_{[500-630]}/R_{[360-740]}$ ) c) la reflectancia entre 630-740 nm para el croma rojo ( $C_{UV} = R_{[630-740]}/R_{[360-740]}$ ) y d) La saturación espectral se calculó por medio de la resta de la reflectancia máxima menos la mínima (en el rango de 360-740 nm), dividido por el brillo promedio ( $C_h = (R_{max} - R_{min})/B_M$ ), donde  $B_M = R_{[360-740]}/N_\lambda$  ( $N_\lambda$  = número de longitudes de onda).

De igual manera que con la talla corporal, se intentó analizar las medidas de color con un análisis de componentes principales. Sin embargo, se obtuvieron siete componentes que no explican la distribución de las medidas. Los primeros CPs no explicaron mucha varianza y presentaron valores propios insuficientes ( $e < 1$ ; ver Tabla 11.3 en Anexos).

Debido a la multiplicidad de variables y al no encontrarse diferencias en las reflectancias de coloración entre las aletas dorsales y las ventrales de los peces, se obtuvo el promedio de los dos valores de la aleta dorsal (1 y 2) y de los dos valores de la aleta ventral (3 y 4), comparando así, el valor promedio total de las aletas entre grupo control y grupo experimental. Tampoco se encontraron diferencias en la reflectancia de

los valores del cuerpo, por lo que se promediaron los tres valores del cuerpo (6, 7 y 8). Los valores de la aleta caudal (5) fueron comparados separadamente debido a que solo se tomó una medida de esta aleta.

Los datos fueron normales (Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ ) por lo que los análisis estadísticos fueron hechos con pruebas paramétricas. Así, para comparar los efectos del tratamiento en la coloración de los peces, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con un modelo mixto considerando como factores independientes: 1. Generación, 2. Sexo y 3. Tratamiento, y las interacciones 1-2, 1-3, 2-3 y 1-2-3 (ver Tabla 11.4. en Anexos). El análisis fue hecho en el programa estadístico SPSS versión 15.0.

#### **5.2.4. Resultados**

La diferencia entre las generaciones fue significativa en todos los cromas: a) coloración UV, b) amarilla, c) roja y d) saturación espectral total, en todas las partes del cuerpo: 1. Aletas, 2. Cuerpo y 3. Cola. Esto indica una pérdida de la reflectancia de la coloración a lo largo de las generaciones (ver Tabla 11.4 en Anexos).

Las diferencias entre el sexo fueron marcadas en la coloración UV, amarilla, roja y croma total de las aletas dorsal, ventral y caudal. Las diferencias se observaron principalmente en la generación F3. Las diferencias entre tratamientos fueron significativas en algunos casos, principalmente en aletas y exclusivamente en los machos. La Tabla 11.4 de los anexos (ver apartado 11.1) muestra los promedios de cada caso comparando entre los factores independientes y sus interacciones y muestra solamente los ANOVAS en los cuales la diferencia fue significativa.

Para evaluar las diferencias entre machos y hembras en cada coloración y poder analizar en cuál generación hubo diferencias significativas, se hicieron ANOVAS comparando separadamente machos y hembras en cada generación. Las gráficas se encuentran detalladas a continuación.

## 1. Aletas

a) La coloración ultra violeta en las aletas de las hembras no fue diferente entre tratamiento en ninguna generación. En los machos tampoco fue significativamente diferente en la primera o en la tercera generación. Sin embargo, en la segunda generación la diferencia de coloración UV de las aletas fue significativa entre tratamientos, siendo menor la reflectancia de los machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.125 \pm 0.001$ , N=7) que de los experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.128 \pm 0.000$ , N=11.  $F_{1,16}=6.45$ ,  $p=0.02$ ; Fig. 5.2.1).

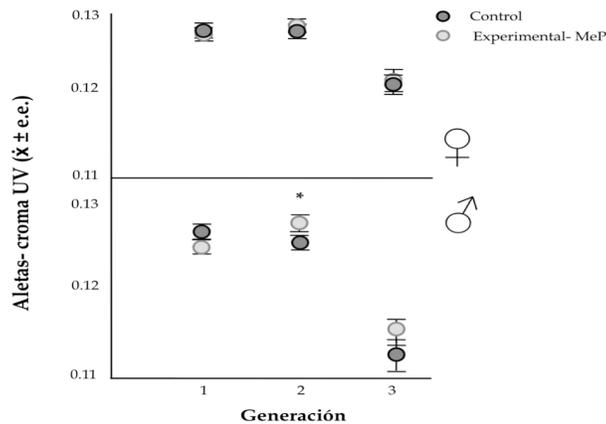


Fig. 5.2.1. Reflectancia de cromas UV en aletas en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

b) La reflectancia de amarillo en las aletas de las hembras no fue diferente entre tratamientos en ninguna generación. En los machos tampoco fue significativamente diferente en F1 o F2. Sin embargo, en la tercera generación F3, la diferencia de coloración amarilla de las aletas fue significativa entre tratamientos, siendo mayor en machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.396 \pm 0.005$ , N=8) que en experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.385 \pm 0.002$ , N=16.  $F_{1,22}=7.74$ ,  $p=0.01$ ; ver Fig. 5.2.2.).

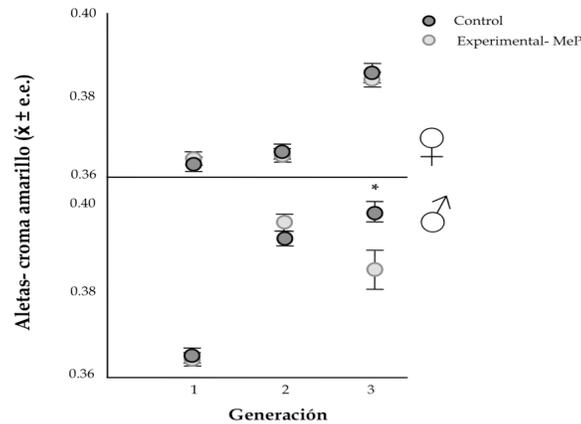


Fig. 5.2.2. Reflectancia de croma amarillo en aletas en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

c) La reflectancia del rojo en las aletas de las hembras no fue diferente entre tratamientos en ninguna generación. En los machos tampoco fue significativamente diferente en la primera o en la segunda generación. Sin embargo, en la tercera generación la diferencia de reflectancia del color rojo de las aletas fue significativa entre tratamientos, siendo mayor en machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.270 \pm 0.003, N=8$ ), que en experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.264 \pm 0.001, N= 16$ .  $F_{1,22}=4.97, p= 0.04$ ; ver Fig. 5.2.3).

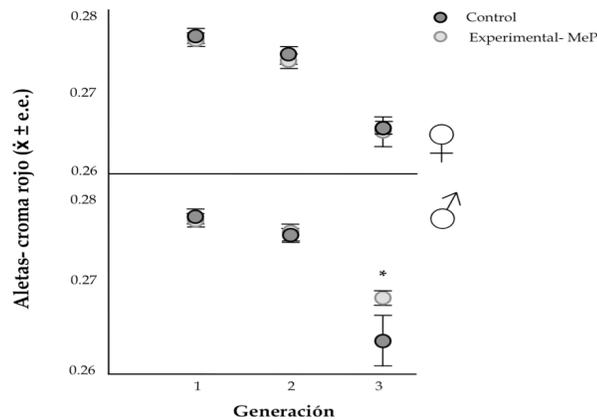


Fig. 5.2.3. Reflectancia de croma rojo en aletas en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

d) La saturación total de croma en las aletas de las hembras no fue diferente entre tratamiento en ninguna generación. En los machos tampoco fue significativamente

diferente en la primera generación. Sin embargo, en la segunda y tercera generaciones la diferencia del cromatismo total de las aletas de los machos fue significativa entre tratamientos, siendo menor en los machos del grupo control que en los machos del grupo experimental en ambas generaciones (F2; control,  $\bar{x} \pm e.e. = 0.604 \pm 0.027$ , N=7; experimental,  $\bar{x} \pm e.e. = 0.760 \pm 0.049$ , N=11.  $F_{1,16}=5.64$ ,  $p= 0.03$ . F3; control,  $\bar{x} \pm e.e. = 1.642 \pm 0.052$ , N=8; experimental,  $\bar{x} \pm e.e. = 1.859 \pm 0.100$ , N=16.  $F_{1,22}=11.84$ ,  $p= 0.02$ ; ver Fig. 5.2.4.).

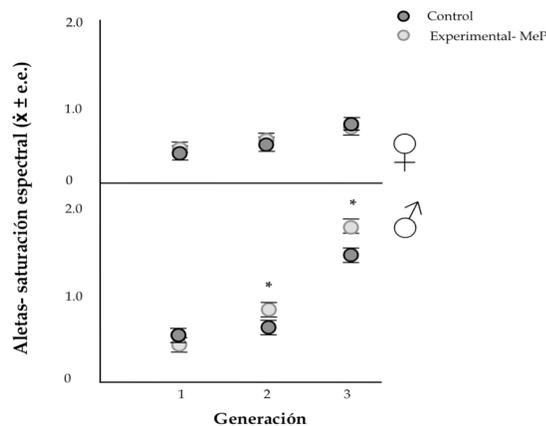


Fig. 5.2.4. Saturación espectral total en aletas en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

## 2. Cuerpo

a) La reflectancia de UV en el cuerpo de las hembras no fue diferente entre tratamientos en ninguna generación. Tampoco hubo diferencias significativas del UV entre tratamientos en el cuerpo de los machos en F1 o F2. Sin embargo, en la tercera generación la diferencia de reflectancia de UV del cuerpo fue significativa entre tratamientos, siendo mayor en machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.124 \pm 0.000$ , N=8), que en experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.119 \pm 0.001$ , N= 16.  $F_{1,22}=4.97$ ,  $p= 0.04$ ; ver Fig. 5.2.5.).

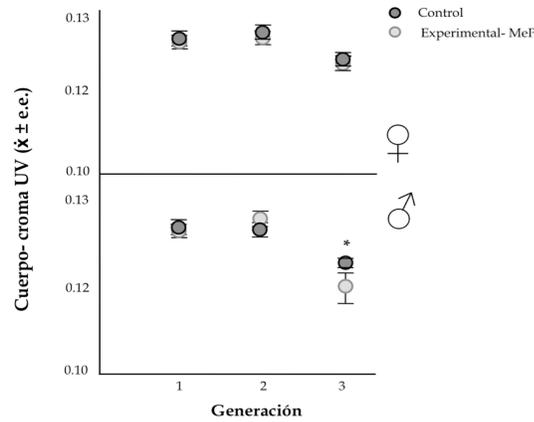


Fig. 5.2.5. Reflectancia del croma UV en el cuerpo en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

b) La reflectancia de amarillo en el cuerpo de las hembras no fue diferente entre tratamiento en ninguna generación. Tampoco hubo diferencias significativas entre tratamientos del amarillo en el cuerpo de los machos en F1 o F2. Sin embargo, en los machos, en la tercera generación la diferencia de reflectancia del color amarillo del cuerpo fue significativa entre tratamientos, siendo mayor en machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.388 \pm 0.003$ ,  $N=8$ ), que en experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.379 \pm 0.001$ ,  $N= 16$ .  $F_{1,22}=4.97$ ,  $p= 0.04$ ; ver Fig. 5.2.6).

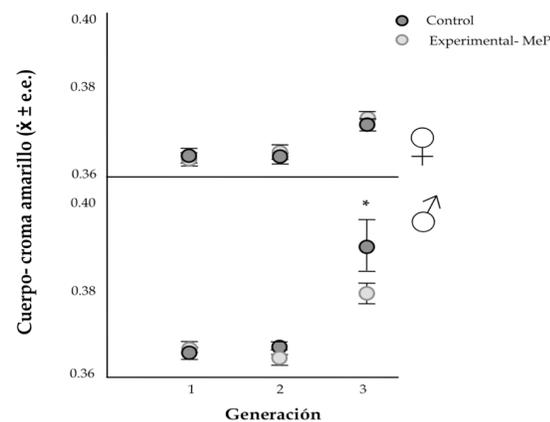


Fig. 5.2.6. Reflectancia del croma amarillo en el cuerpo en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

c) La coloración de rojo del cuerpo de las hembras y de los machos no fue diferente entre tratamientos en ninguna generación (ver Fig 5.2.7.).

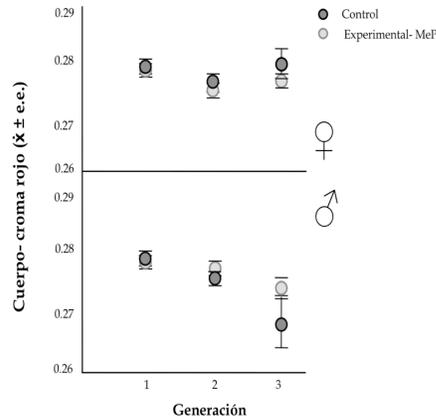


Fig. 5.2.7. Reflectancia del croma rojo en el cuerpo en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

d) La saturación espectral total del cuerpo siguió un patrón similar. No hubo diferencias en la saturación espectral del cuerpo en las hembras. La saturación espectral del cuerpo de los machos tampoco fue significativamente diferente en la primera o en la segunda generación. Sin embargo, en la tercera generación la diferencia de saturación fue significativa entre tratamientos, siendo menor en los machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 1.412 \pm 0.001$ ,  $N=7$ ) que en los experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 1.648 \pm 0.001$ ,  $N=11$ .  $F_{1,16}=17.84$ ,  $p= 0.000$ ; ver Fig. 5.2.8).

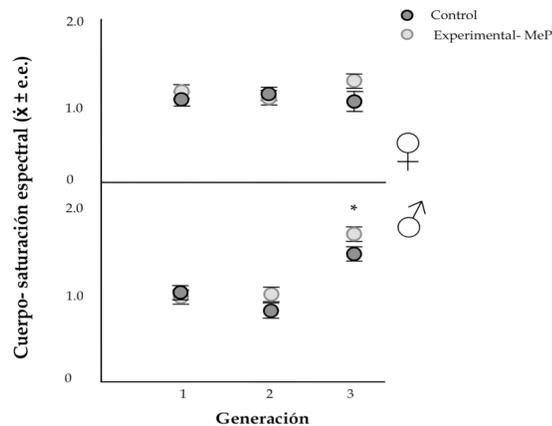


Fig. 5.2.8. Saturación espectral total en el cuerpo en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

### 3. Aleta caudal

a) La reflectancia de UV en la aleta caudal de las hembras no fue diferente entre el grupo control y experimental. De la misma manera los machos tampoco difirieron en la coloración UV de la aleta caudal en ninguna generación (ver Fig. 5.2.9.).

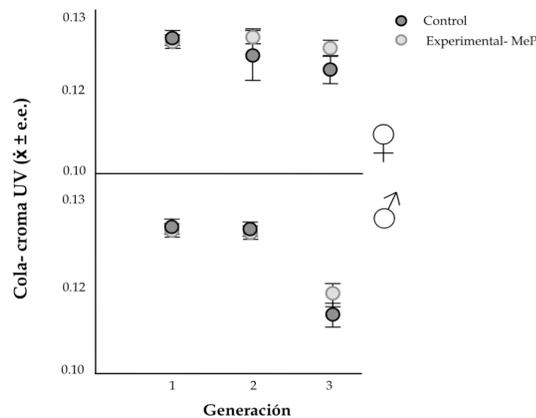


Fig. 5.2.9. Reflectancia del croma UV en la aleta caudal en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

b) La coloración amarilla de la aleta caudal no mostró diferencias significativas ni en las hembras ni en los machos en ninguna generación (ver Fig. 5.2.10.).

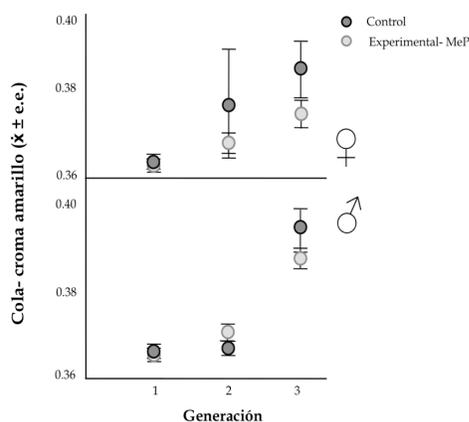


Fig. 5.2.10. Reflectancia del croma amarillo en la aleta caudal en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

c) Lo mismo ocurrió con la reflectancia de rojo de la aleta caudal; no hubo diferencias significativas para este cromóforo en las hembras o en los machos en ninguna generación (ver Fig. 5.2.11.).

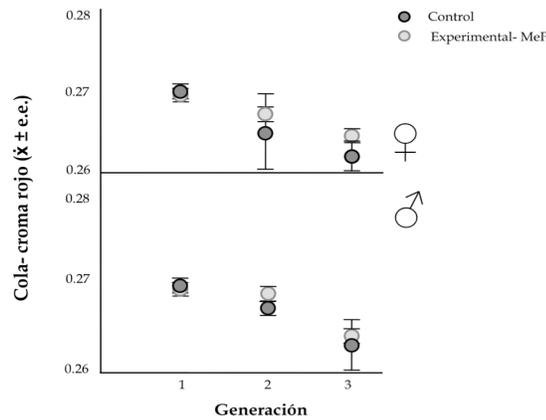


Fig. 5.2.11. Reflectancia del cromóforo rojo en la aleta caudal en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

d) Tampoco hubo diferencias en la saturación espectral de la aleta caudal de las hembras. La saturación espectral de la aleta caudal de los machos tampoco fue significativamente diferente en la primera o en la tercera generación. Sin embargo, en la segunda generación la diferencia de saturación fue significativa entre tratamientos, siendo menor en los machos controles ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.612 \pm 0.031$ ,  $N=7$ ) que en los experimentales ( $\bar{x} \pm e.e. = 0.848 \pm 0.040$ ,  $N=11$ ,  $F_{1,16}=17.76$ ,  $p= 0.000$ ; ver Fig. 5.2.12.).

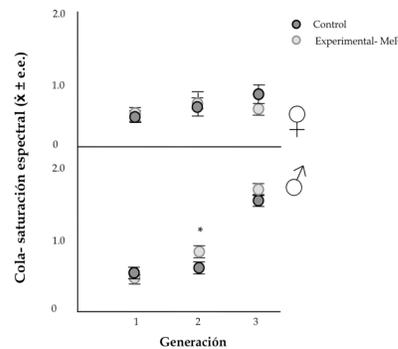


Fig. 5.2.12. Saturación espectral total en la aleta caudal en tres generaciones. Hembras en la parte superior y machos en la inferior.

### **5.2.5. Conclusiones**

No hubo ninguna diferencia en ningún patrón de coloración en la primera generación. Se observó que las diferencias de coloración fueron aumentando de modo gradual en las generaciones. En la primera generación no hay ninguna diferencia significativa debido al tratamiento en machos o en hembras. Las diferencias significativas entre tratamientos sólo ocurrieron a partir de la segunda generación y aún así no en todas las partes del cuerpo ni en todas las reflectancias medidas. La tercera generación presentó diferencias significativas debido al tratamiento principalmente en las aletas de los machos. Se observó un gradiente intergeneracional en la reflectancia de la coloración de los peces, en especial para el croma amarillo. Las diferencias observadas en la segunda generación muestran una dirección y las reflectancias fueron significativamente más marcadas en la tercera generación. Este gradiente puede ser reflejo del deterioro del cautiverio y en los casos donde se observaron diferencias debido al tratamiento, reflejo de los efectos del contaminante acumulables a lo largo de las generaciones.

Los efectos en el cambio de coloración ocasionados por el contaminante, es decir, diferencias significativas debidas al tratamiento, fueron detectadas exclusivamente en los machos. Es decir, no se encontraron diferencias de reflectancia debidas al tratamiento en las hembras, en ninguna generación ni coloración. Esto indica que los machos pueden estar enfrentando disyuntivas entre usar sus carotenoides para el mantenimiento de la coloración de ornamentos o utilizarlos como antioxidante en el mecanismo de desintoxicación por reacción oxidativa. Un indicativo de esto es que el croma que presentó mayor alteración debido al tratamiento fue el amarillo, croma dependiente de carotenos. En la saturación espectral total se encontraron patrones de coloración mayores en el grupo experimental que en el control. Esto puede ser debido a que una saturación de croma total elevada refleja una coloración oscura, es decir, un color saturado tiende a ser opaco. Esta coloración puede ser debida a la baja condición de salud de los peces ya que peces estresados direccionan sus recursos oxidativos a combatir los radicales libres y no a la coloración espectral. Por lo que este resultado

indica que los individuos expuestos enfrentan un costo frente a la descontaminación de su organismo (Hill, 2000; McGraw & Ardia, 2003; Sparkes et *al.*, 2008).

El croma UV presenta patrón similar. Los individuos expuestos que presentaron mayor reflectancia de UV también deben estar frente a una disyuntiva en su coloración. Esto debido a que la coloración de UV es estructural y no espectral, es decir, individuos con mayor coloración UV normalmente presentan menor coloración espectral de carotenos (Sparkes et *al.*, 2008).

El hecho de no haber encontrado diferencias significativas en las hembras debido al tratamiento no quiere decir que la coloración de las hembras no se vea afectada por el MeP, pero se puede sugerir que los efectos sólo son cuantificables en machos debido a que ellos presentan mayores patrones de coloración ya que son los que portan los ornamentos de atractivo sexual.

---

**Capítulo segundo****6. SELECCIÓN INTERSEXUAL EN*****Girardinichthys multiradiatus*****6.1 Selección Sexual**

El término selección sexual fue inicialmente propuesto por Charles Darwin (1859) como una alternativa al proceso de Selección Natural para explicar por qué diferentes especies de animales presentan estructuras fenotípicas conspicuas que podrían disminuir su supervivencia. Darwin sugirió que estas estructuras son rasgos atractivos sexualmente y se mantienen por ser utilizados como criterio de elección de pareja durante el apareamiento. Actualmente, la Selección Sexual se define como la adecuación diferencial entre los individuos que resulta de la competencia de los miembros de un sexo (normalmente el masculino), por el acceso al otro (O'Donald, 1962, 1967; Bradbury & Andersson, 1987; Carranza, 2009).

Darwin diferenció dos mecanismos responsables de la formación de ornamentos, caracteres epigámicos o rasgos sexuales que posteriormente fueron denominados como selección intrasexual e intersexual. El primer mecanismo se refiere a la disputa entre individuos del mismo sexo, generalmente el masculino, donde los portadores tienen ventaja en el acceso directo a individuos del sexo opuesto, generalmente hembras (Lande & Arnold, 1984; Constanz, 1984; Andersson, 1994; Alcock 1998; Dugatkin, 2004). El segundo mecanismo se refiere a la elección de pareja que ocurre entre machos y hembras, donde los rasgos son normalmente resultado de la preferencia de individuos del otro sexo. Los rasgos que resultan de estos mecanismos son exhibidos mayoritariamente en el sexo masculino. Los ornamentos atractivos, conductas sexuales, regalos nupciales, cuidado parental y comportamiento de cortejo,

son resultado de este mecanismo (Lande & Arnold, 1984; Andersson & Simmons, 2006; Alcock 1998; Dugatkin, 2004).

Los caracteres epigámicos pueden ser rasgos morfológicos estructurales (i.e., el plumaje de la cola de los pavorreales, la coloración de aves y peces), conductuales (cortejos elaborados), o manifestarse por señales químicas, auditivas y visuales (Darwin, 1859; Reynolds & Gross, 1990; Krebs & Davies, 1993; Andersson, 1994; Alcock 1998; Dugatkin, 2004). Las presiones de selección sexual sobre los rasgos de los machos son más fuertes en los sistemas de apareamiento polígamos (O'Donald, 1973; Kokko et al, 2003). En este sistema machos y hembras pueden tener más de un apareamiento en una misma temporada reproductiva. Por lo tanto, la disputa que los machos enfrentan por acceder al apareamiento con las hembras es mayor y más intensa (Andersson, 1982, 1994; Alcock, 1998; Shusters & Wade, 2003; Dugatkin, 2004).

#### 6.1.1. Elección de pareja en *Girardinichthys multiradiatus*

La elección de pareja es un proceso que promueve y mantiene los caracteres epigámicos que caracterizan el dimorfismo sexual (Endler & Mc Lellan 1988; Bell, 1997). Normalmente, los miembros del sexo masculino suelen tener caracteres sexuales secundarios más conspicuos y elaborados que las hembras. La gran variedad de caracteres sexuales secundarios que se encuentran en la naturaleza, como los mencionados anteriormente, sugiere que el mecanismo de elección de pareja es una fuerza evolutiva potente (Darwin, 1871; Trivers, 1972; Gould & Gould, 1997; Andersson, 1994; Candolin & Wong, 2008)

El estudio de la selección sexual se puede enfocar en la elección de la hembra. El cómo las hembras expresan sus preferencias por los atributos sexuales de los machos sirve como indicativo de cuáles son las consecuencias del proceso de selección sexual. La mayoría de los estudios sobre elección de pareja en peces también se basan en la preferencia de la hembra. Así como se ha mencionado, las hembras de peces normalmente manifiestan su preferencia por el macho que presenta

las características reproductivas más atractivas (Candolin & Wong, 2008, i.e. ver 6.2. y 1.1.1.).

En este contexto, un sistema frecuente de estudio de selección sexual mediado por la preferencia de la hembra se encuentra en peces. Esto ocurre por la facilidad para el control y manipulación de variables en los experimentos realizados en ambientes cerrados como peceras, acuarios, etc. Además, la gran diversidad de especies de peces supone la existencia de diferentes modos e intensidades de selección sexual (Amundsen, 2003; Candolin & Wong, 2008; Magnhagen et al., 2008).

El pez guppy es uno de los principales modelos de estudio de selección sexual (ver 1.1.4). Las hembras de guppy indican su preferencia aproximándose y manteniéndose cerca del macho preferido. Se ha observado que en el pez guppy (*Poecilia reticulata*) en el trispinado (*Gasterosteus aculatus*) y en el cola de espada (*Xiphophorus maculatus*) la preferencia de la hembra está relacionada con el ornamento, el cortejo y la condición física de los machos (Basolo, 1990; Sargent et al., 1998). Además, en pruebas de preferencia donde se observó la elección de las hembras de guppy por determinados machos, se hicieron análisis genéticos posteriores que comprobaron que la paternidad de la progenie corresponde al macho considerado preferido con quien la hembra pasó más tiempo. Estos resultados corroboran afirmaciones de que el acercamiento de una hembra refleja su elección e indica que la probabilidad de que la hembra se reproduzca con un macho que demostró ser su preferido es elevada (Constanz, 1984; Aspbury & Basolo, 2002; Magurran, 2005).

Actualmente sigue siendo una pregunta central en biología evolutiva tratar de entender cómo y por qué evoluciona la elección de apareamiento de las hembras. Al mismo tiempo, se ha observado que las perturbaciones ecológicas ocasionadas por el hombre son uno de los motivos de las alteraciones en la selección sexual y elección de pareja observadas en el hábitat natural de especies acuáticas. En el pez guppy, se ha observado que la exposición a plaguicidas ocasionó una alteración de la conducta de cortejo en los machos y por ende en la preferencia de las hembras (Baatrup & Junge, 2001). Los efectos ambientales que dificultan la expresión de los caracteres epigámicos

pueden producir por lo tanto, machos no aceptables por las hembras (Lindström & Mary, 2008).

Estas presiones de selección sexual, que han moldeado las conductas de elección de pareja, han sido estudiadas en otros organismos, entre ellos en el pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus*. Mi especie de estudio también sirve como un buen modelo debido a sus características ecológicas y reproductivas (ver 1.1.1). En el caso del pez amarillo, los ornamentos atractivos son las aletas dorsales y ventrales grandes y coloridas. Además, el macho ejecuta un complejo despliegue de cortejo debido a que la hembra puede efectivamente rechazar el apareamiento en caso de que el macho no le resulte atractivo (diferente de lo que ocurre en guppies, por ejemplo, ver 1.1.4.). El resultado es una elección de pareja por parte de la hembra. Las hembras seleccionan a los machos discriminando entre algunas características durante el apareamiento. Igualmente que en guppies (ver 1.1.4), las hembras suelen preferir a machos con talla corporal más grande, con mayor volumen y longitud estándar (LE), y con caracteres conspicuos de coloración. También prefieren a machos que despliegan sus conductas de cortejo de manera más completa e intensamente. (Macías García, 1991; Macías García *et. al.*, 1994; Macías García & Burt de Perera, 2002; Burt de Perera & Macías García, 2003, ver 1.1.1).

Así como en guppies, se ha observado que la hembra *G. multiradiatus* se aproxima y se mantiene cerca del macho elegido. Por otro lado, se ha observado que la duración en que la hembra se encuentra cerca del macho es el factor más relevante que caracteriza la preferencia de las hembras y la mayor probabilidad de paternidad (González Zuarth & Macías García, 2006).

Actualmente sigue siendo una pregunta central en la biología evolutiva tratar de entender cómo y porqué evoluciona la elección de apareamiento de las hembras (Kirkpatrick, 1982; Jennions & Petrie, 1997). En este trabajo se indagó la preferencia de las hembras en *G. multiradiatus* frente al problema de la exposición de contaminantes a concentraciones subletales. En particular, se evaluó la posibilidad de que la exposición a un insecticida organofosforado, el metil paratión-MeP, reduzca el atractivo de machos de *G. multiradiatus*

## **6.2 Objetivos**

Determinar si la exposición al MeP afecta a los machos *G. multiradiatus* de manera que las hembras prefieran a machos del grupo control. Esto se hizo comparando los siguientes parámetros de respuesta de la preferencia sexual entre machos expuestos al MeP y machos no expuestos:

- La frecuencia de visitas de las hembras a cada macho.
- La duración promedio de cada visita de las hembras a cada macho.
- La duración total de visitas de las hembras a cada macho.

Para esto se realizaron pruebas de preferencia de la hembra mediante exposición simultánea de machos adultos, uno del grupo control y uno del grupo experimental expuesto al contaminante MeP en las generaciones F1 y F2.

## **6.3 Hipótesis y predicciones**

Si la expresión de los rasgos sexuales secundarios es afectada por la exposición al MeP, las hembras deberán preferir machos del grupo control no expuestos al contaminante sobre los del grupo experimental expuestos al MeP. Se espera que en pruebas de exposición simultánea las hembras se aproximen más y permanezcan más tiempo cerca de los machos del grupo control.

## **6.4 Métodos**

Se cuantificó la preferencia de las hembras de *G. multiradiatus* por machos controles o experimentales por medio de pruebas dicotómicas de elección simultánea (Martin & Bateson, 1986, 1993; Wagner, 1998). Las pruebas consistieron en registrar la frecuencia y duración de visitas de una hembra sexualmente receptiva hacia dos

machos presentados simultáneamente, uno del grupo control no expuesto a contaminante y uno del grupo experimental expuesto al MeP. La frecuencia fue cuantificada por el número de veces que la hembra se encontró cerca ( $\leq 5$  cm distancia) de un macho, control o experimental. Se midieron dos parámetros de la duración de las visitas de la hembra. La duración promedio fue referente al tiempo promedio de cada visita que la hembra estuvo a esa distancia del macho y la duración total fue el resultado de la suma del tiempo (en segundos) que la hembra permaneció a esa distancia del macho.

Para evitar que la preferencia de la hembra se debiese a la talla de los machos (Macías García, 1991), se midió la longitud estándar (LE) de cada macho previamente a la formación de los pares. El macho más grande del grupo control fue apareado con el macho más grande del grupo experimental, el segundo macho más grande del grupo control fue apareado con el segundo macho más grande del grupo experimental y así sucesivamente hasta agotar los machos que se pudieron utilizar para la realización de las pruebas. Se utilizó el mismo método para la formación de los pares en las generaciones siguientes, por lo tanto, los machos de cada par presentaron tallas y pesos similares entre sí. La diferencia en las tallas (LE) y los pesos es mayor entre los pares que intrapar (F1; Tallas  $t=-2.31$ ,  $p=0.460$ ; Pesos  $t=-1.37$ ,  $p=0.204$ . F2; Tallas  $t=1.37$ ,  $p=0.221$ ; Pesos  $t= 1.04$ ,  $p=0.339$ ).

Durante la realización de las pruebas de preferencia se verificó que ninguno de los machos presentados a las hembras fuera de su misma pecera de procedencia ya que la familiaridad y reconocimiento en los peces podría darse a partir de 12 días de convivencia (Griffiths & Magurran, 1997; Hughes et al, 1999), y con eso haber preferencia o repulsión por parte de la hembra a machos conocidos. Tampoco se hicieron cambios o sustituciones de los machos después de la formación de los pares. Los machos solamente fueron expuestos a hembras de su misma generación.

El día anterior a la realización de la prueba (entre 17h y 20h antes) una hembra elegida aleatoriamente, control o experimental, fue separada en una pecera de observación de 40L para su aclimatación. Inmediatamente antes de iniciar las pruebas se instaló un divisor opaco en la pecera para aislar a la hembra física y visualmente del

área donde posteriormente se ubicó el par de machos. Los machos fueron colocados individualmente dentro de bolsas plásticas transparentes conteniendo agua de su propia pecera y puestos uno en cada esquina del área que permanecía bloqueada para la hembra. La posición de los machos fue alternada de manera que cada macho estuvo la mitad de las pruebas en la esquina izquierda y la otra mitad en la derecha en las peceras de observación en las dos generaciones, es decir no hubo una tendencia a que machos controles estuvieran más de un lado que del otro o vice versa ( $F1; \chi^2=0.400$   $p=0.940$ ,  $F2; \chi^2= 1.286$ ,  $p=0.257$ ). Para iniciar la prueba el divisor opaco fue retirado de manera que los machos fueron simultáneamente expuestos a la hembra y ésta pudo desplazarse libremente hacia cada uno de ellos (Fig. 6.1).

Cada prueba duró 20 minutos y los registros empezaron después de cinco minutos para permitir la aclimatación de los peces. El observador que realizó los registros desconocía el grupo de origen de los machos. Las pruebas fueron realizadas entre las 12h y las 15h con el fin de que la conducta de los peces no fuera diferente por su ciclos circadianos.

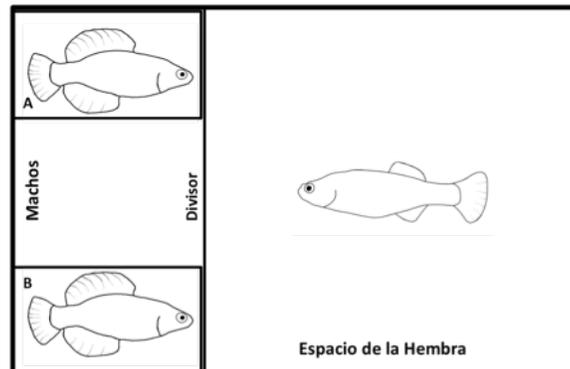


Fig. 6.1 Esquema ilustrativo de la pecera en la cual se evaluaron las preferencias de la hembra. Se observa el par de machos, A y B, cada uno (control o experimental) en una esquina de la pecera de observación aislados físicamente y visualmente de la hembra por un divisor opaco. Después de aclimatados, el divisor fue retirado para la realización de las pruebas.

Cada hembra fue expuesta solamente a un par de machos, y como en ambas generaciones había más hembras que pares de machos, cada par se usó más de una

vez en las pruebas de preferencia. Las hembras no se repitieron debido a que su elección no tiende a cambiar en diferentes pruebas de preferencia (Brooks, 2006). Las hembras fueron evaluadas individualmente (ver Fig. 6.1) debido a que una hembra puede presentar la tendencia de imitar la conducta de otra y no demostrar su propia preferencia (Dugatkin, 1992).

La cantidad de pruebas realizadas en las generaciones F1 y F2 fue diferente debido al desigual número de adultos disponibles. No se realizaron pruebas de preferencia en la generación F3 y F4 debido a la insuficiente cantidad de machos útiles para la formación de pares (i.e. machos de tallas similares de ambos grupos no enfermos y sin deformaciones morfológicas). Las diferencias en el número pares de machos y del número de hembras en cada generación pueden ser observadas en la Tabla 6.1.:

Tabla 6.1. Pruebas de preferencia en las generaciones F1 y F2. Número de pares de machos, número hembras expuestas (controles y experimentales) y cantidad de pruebas de preferencia realizada con los pares de machos (promedio  $\pm$  e.e.).

	Pares de Machos	Hembras		Pruebas	Pruebas por par
		Controles	Experimentales		
<b>F1</b>	<b>10</b>	<b>34</b>	<b>38</b>	<b>72</b>	<b>7.4 <math>\pm</math> 0.62</b>
<b>F2</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>5 <math>\pm</math> 0.00</b>

Se evaluó si existían diferencias en las preferencias de las hembras de cada tratamiento en ambas generaciones, es decir, si las hembras del grupo control preferirían más o menos a los machos de un grupo que las hembras del grupo experimental. El objetivo de este análisis fue observar si las hembras de algún grupo discriminan más que las del otro, y si los resultados finales podrían ser consecuencia solamente de las respuestas de las hembras experimentales, dado que hubo un mayor número de hembras del grupo experimental en ambas generaciones.

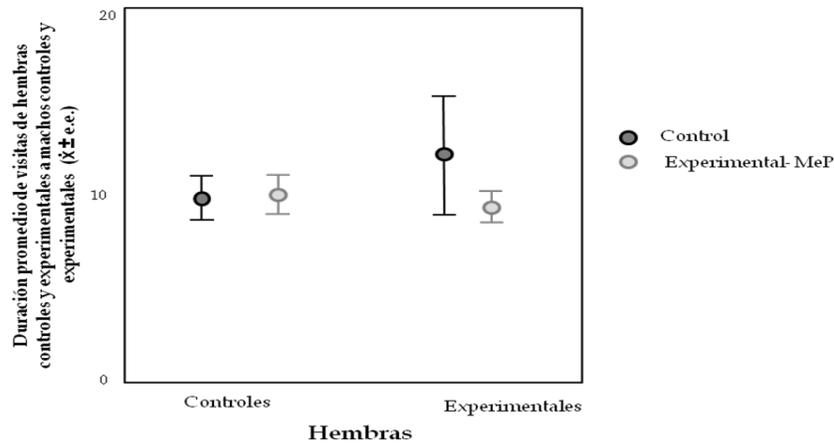


Fig. 6.5. Duración promedio de las visitas de las hembras del grupo control y experimental a machos control y experimental. No hay diferencia entre los tratamientos de las hembras. Tampoco se encontraron diferencias en la duración total o en la frecuencia de visitación.

No se encontraron diferencias significativas de la elección femenina de acuerdo a su tratamiento, es decir, no hay diferencia en la respuesta de las hembras por ser del grupo control o del experimental en ninguna de las generaciones (F1 y F2), en ninguna variable. La frecuencia de visitas no difirió a los machos control ( $F_{1,106}=0.001$ ,  $p = 0.972$ ) o a los experimentales ( $F_{1,106}=0.163$ ,  $p = 0.688$ ). La duración promedio de las visitas a los machos control Se evaluó si existían diferencias en las preferencias de las hembras de cada tratamiento en ambas generaciones, es decir, si las hembras del grupo control preferirían más o menos a los machos de un grupo que las hembras del grupo experimental. El objetivo de este análisis fue observar si las hembras de algún grupo discriminan más que las del otro, y si los resultados finales podrían ser consecuencia solamente de las respuestas de las hembras experimentales, dado que hubo un mayor número de hembras del grupo experimental en ambas generaciones.

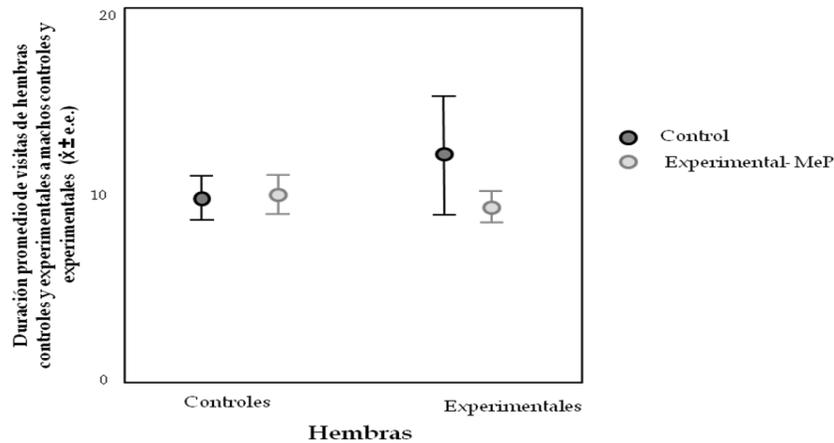


Fig. 6.5. Duración promedio de las visitas de las hembras del grupo control y experimental a machos control y experimental. No hay diferencia entre los tratamientos de las hembras. Tampoco se encontraron diferencias en la duración total o en la frecuencia de visitación.

No se encontraron diferencias significativas de la elección femenina de acuerdo a su tratamiento, es decir, no hay diferencia en la respuesta de las hembras por ser del grupo control o del experimental en ninguna de las generaciones (F1 y F2), en ninguna variable. La frecuencia de visitas no difirió a los machos control ( $F_{1,106}=0.001$ ,  $p = 0.972$ ) o a los experimentales ( $F_{1,106}=0.163$ ,  $p = 0.688$ ). La duración promedio de las visitas a los machos control ( $F_{1,106}=0.426$ ,  $p = 0.515$ ) o a los experimentales ( $F_{1,106}=0.216$ ,  $p = 0.643$ ), no difirió entre los tratamientos de las hembras, tampoco la duración total de visitas a los machos control ( $F_{1,106}=0.187$ ,  $p = 0.666$ ) o a los machos experimentales ( $F_{1,106}=0.125$ ,  $p = 0.724$ ; Fig. 6.5).

Los datos no presentaron distribución normal (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.05$ ) por lo que los análisis estadísticos fueron hechos con pruebas paramétricas. Para comparar si la exposición al MeP afecta a los machos de modo que las hembras prefieran a los machos del grupo control, se hicieron análisis de t de student. Los análisis fueron hechos con el programa estadístico SPSS versión 15.0.

## 6.5 Resultados

Se analizaron tres variables para comparar la preferencia de las hembras por los machos del grupo control o del experimental: la frecuencia, la duración promedio por visita y la duración total de visitas en la primera (F1) y segunda generación (F2).

La frecuencia de visitas de las hembras a los machos control ( $8.22 \pm 0.78$ - promedio  $\pm$  e.e.), fue similar a la frecuencia de visitas a los machos experimentales ( $8.97 \pm 0.83$ ) en F1. No hubo diferencias significativas en la frecuencia de visitas de las hembras en la generación F1 ( $t_{1,71} = -1.094$ ,  $p = 0.278$ ). De igual modo, la frecuencia de visitas de las hembras a los machos control ( $8.74 \pm 1.29$ ), fue similar a la frecuencia de visitas a los machos experimentales ( $6.34 \pm 0.99$ ) en F2. Tampoco se observaron diferencias significativas de la frecuencia de visitas de las hembras en la generación F2 ( $t_{1,35} = 0.859$ ,  $p = 0.397$ ). Esto significa que las hembras visitaron un número similar de veces a los machos controles y a los machos experimentales en ambas generaciones (Fig. 6.2).

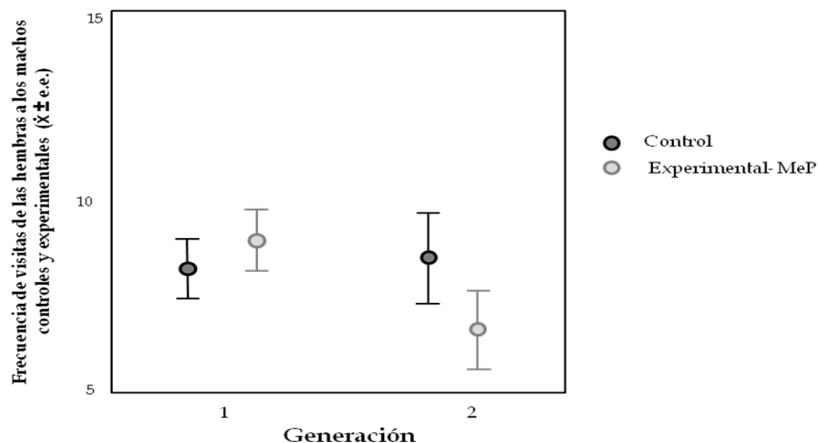


Fig. 6.2 Frecuencia de visitas de las hembras a machos controles y experimentales en ambas generaciones.

La duración promedio (en segundos) de cercanía de las hembras a los machos controles ( $11.01 \pm 1.76$ ) fue similar a los machos experimentales ( $10.57 \pm 0.88$ ) en F1.

No hubo diferencia significativa en la duración promedio de visitas de la hembra a machos controles o experimentales en la generación F1 ( $t_{1, 72} = 0.243$ ,  $p = 0.809$ ). Sin embargo, la duración promedio de permanencia de las hembras cerca a machos controles ( $11.04 \pm 1.43$ ), fue mayor que a machos experimentales ( $0.75 \pm 0.91$ ) en F2. Se encontró una diferencia significativa en la duración promedio de visitas de la hembra en la generación F2 ( $t_{1, 35} = 7.670$ ,  $p = 0.000$ ). Las hembras de la generación F2 permanecieron más tiempo cerca de los machos controles que de los experimentales (Fig. 6.3).

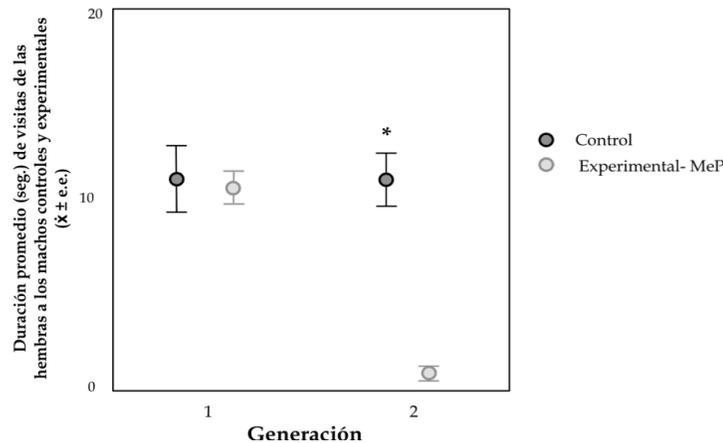


Fig. 6.3. Duración promedio de visitas de las hembras a machos controles y experimentales en F1 y F2.

El resultado fue el mismo para la duración total (en segundos) de las visitas de las hembras. En F1 las hembras no diferenciaron entre los machos controles ( $114.88 \pm 22.17$ ) y experimentales ( $121.86 \pm 14.64$ ;  $t_{1, 72} = -0.305$ ,  $p = 0.761$ ). Sin embargo, la duración total de permanencia de las hembras cerca de los machos controles ( $99.20 \pm 13.53$ ) fue mayor que los experimentales ( $60.03 \pm 10.65$ ) en la generación F2. Las hembras permanecieron significativamente más tiempo cerca de los machos del grupo control ( $t_{1, 35} = 7.101$ ,  $p = 0.000$ , Fig. 6.4).

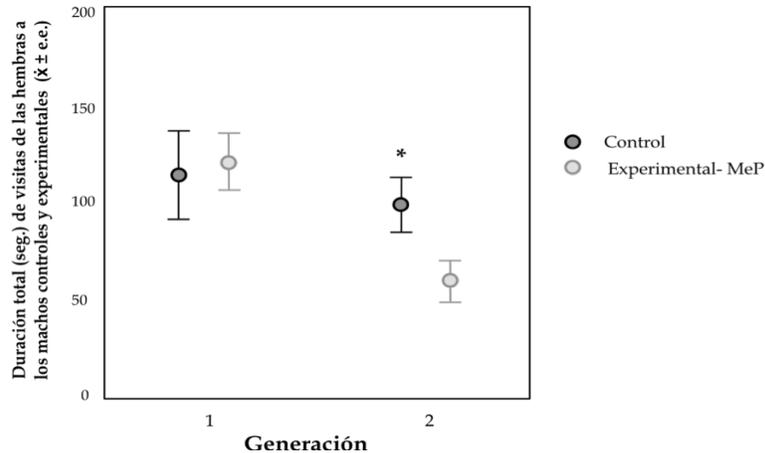


Fig. 6.4 Duración total de visitas de las hembras a machos controles y experimentales en F1 y F2.

Se observó que las hembras en la generación F1 no mostraron una respuesta de preferencia, no presentaron diferencias en la frecuencia de visitas ni en la duración de visitas a los machos de algún grupo. En la generación F2 las hembras también visitaron la misma cantidad de veces a los machos controles y a los experimentales, sin embargo, se observó que permanecieron más tiempo cerca de los machos controles que de los experimentales. Es decir, en F2 las hembras pudieron discernir al visitar los machos de cada grupo y esto influyó en la respuesta de preferencia de las hembras con una mayor duración promedio y mayor duración total de sus visitas cerca a los machos del grupo control.

## 6.6 Conclusiones

Las hembras de *G. multiradiatus* no demostraron preferencia por los machos del grupo control en la generación F1. No obstante, las hembras permanecieron más tiempo cerca de los machos controles en F2. La cercanía y permanencia indica la preferencia de la hembra (ver 6.2.).

El contaminante MeP es neurotóxico y así afecta el desarrollo neurológico de los peces (De La Vega Salazar *et al.*, 1997, Arellano-Aguilar, 2008, ver en 1.2.1.), por lo que es factible que su morfología, locomoción y la ejecución de sus movimientos conductuales sea afectada. Este pez presenta un elevado cortejo como rasgo sexual

distinguible como atractivo para las hembras. Si machos expuestos al contaminante no cortejan con los movimientos adecuados y del modo correcto, esto puede ser el factor principal de la preferencia por machos del grupo control.

Cabe recordar que la diferencia entre F1 y F2 es que los individuos de F1 solamente fueron expuestos al contaminante cuando adultos mientras que los individuos de la segunda generación fueron expuestos cuando embriones. Considerando esta diferencia entre las generaciones, es plausible suponer que los individuos del grupo experimental de la generación F2 tuvieron mayores daños durante su desarrollo embrionario como consecuencia de la exposición temprana al MeP, y que estos daños se reflejaron en la adultez.

Añadiendo estos resultados a los del capítulo primero (ver 5.1.5. y 5.2.5.) en que no se encontraron diferencias en la coloración y en la talla corporal en los machos en la primera generación, pero se observaron perturbaciones debido a la exposición al MeP a partir de la segunda generación, principalmente en la coloración, se puede pensar que las hembras diferenciaron algunos rasgos físicos entre los machos de cada grupo. No obstante, las diferencias observadas por las hembras de F2 para elegir entre los machos controles y experimentales también se pudieron dar por los rasgos conductuales como son los despliegues del cortejo.

Se excluye la posibilidad de preferencia sobre señales químicas o por olfato debido a la manera que se realizaron las pruebas. Es decir, los machos expuestos durante las pruebas se encontraban aislados en compartimentos, por lo que no hubo contacto o flujo del agua entre machos y hembra. No obstante, se ha observado que hembras de guppies (*Poecilia reticulata*), sub-valoran señales olfatorias cuando señales visuales están presentes durante las pruebas (Shohet & Watt, 2004; en Magurran, 2005).

En especies como los goodeidos, en que los machos no aportan recursos a la progenie, es de esperar que la elección femenina se base en atributos que reflejen la calidad genética de los machos. Arellano-Aguilar & Macías Garcia (2008) encontraron que los machos de *G. multiradiatus* expuestos a concentraciones subletales de

contaminantes como el MeP, enfrentan costos energéticos para producir, exhibir y mantener sus rasgos epigámicos sean ellos estructurales o conductuales. Por esto se considera plausible que los ornamentos en esta especie funcionen como señales honestas. Es decir, portar ornamentos en buenas condiciones tiene un costo elevado que parece ser difícil de mantener cuando el macho se enfrenta con la necesidad de desintoxicación. Resultados parecidos han sido observados anteriormente (De la Vega Salazar et al., 1997; Calumpang et al., 1997).

Además, se ha sugerido que los parámetros conductuales como: forrajeo, cortejo, defensa, etc., sean considerados como indicadores de contaminación. La conducta de un individuo es el resultado final de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos, por lo que una mínima alteración en alguna conducta es un indicativo de que estos procesos no están funcionando adecuadamente (Scott & Sloman, 2004).

**Capítulo tercero****7. PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE*****Girardinichthys multiradiatus*****7.1. Demografía y ecotoxicología**

Los parámetros demográficos como fecundidad, mortalidad, estructura de edad, proporción sexual, han sido utilizados como indicadores para averiguar las tasas de crecimiento y las condiciones demográficas generales de las poblaciones (Walker *et al.*, 1996). Algunos parámetros son obtenidos por conteo directo de los animales, por identificación individual, por captura y recaptura. Los conteos posibilitan identificar la estructura de la población y con esto obtener parámetros indirectos como supervivencia, proporción sexual, tasas de crecimiento poblacional y tener un estimador del estatus de conservación general de la población.

Las perturbaciones antropogénicas como la destrucción del hábitat natural por contaminación es un creciente factor que ocasiona alteraciones en los parámetros demográficos. La exposición a contaminantes pueden alterar los patrones naturales, afectar la dinámica de las poblaciones e incluso generar consecuencias en crecimiento poblacional. La exposición a insecticidas puede incluso generar perturbaciones irreversibles a la supervivencia de las poblaciones y al estatus de conservación de la especie.

Los efectos de una exposición letal a contaminantes son parámetros evaluables y de diagnóstico exacto. Sin embargo, evaluar las consecuencias de una población expuesta a concentraciones subletales de insecticidas es diferente. Los efectos normalmente no son visibles al momento de la exposición, pueden perdurar en los individuos y sólo ser evidentes después de largos períodos de tiempo o incluso después de generaciones (Welsh & Hanselka, 1972; Walker *et al.*, 1996).

Efectos ecotoxicológicos en parámetros demográficos han sido cada vez más estudiados en una variedad de organismos acuáticos. En el pez guppy, se observó que machos expuestos a concentraciones subletales de un organofosforado y de un estrógeno natural, tuvieron una menor cantidad de críos o menor fecundidad, lo que altera directamente su éxito reproductivo (Toft & Baatrup, 2001). Las consecuencias de la exposición a contaminantes en otros organismos como en el áfido *Acyrtosiphon pisum* fueron una longevidad y fecundidad reducidas y una tasa de mortalidad elevada en las primeras etapas de vida, lo que reflejó en una menor tasa de crecimiento poblacional (Stark & Rangus, 2006). En el copépodo (*Nitocra spinipes*) también se observaron alteraciones en la reproducción y una reducción en la tasa de crecimiento poblacional (Breitholtz & Wollenberger, 2003).

La reproducción de organismos expuestos a contaminantes puede ser afectada por otras vías. En los caracteres sexuales primarios o órganos reproductivos de peces, se han observado alteraciones morfológicas y fisiológicas como: disfunción e la no maduración de los ovarios y testículos, retraso en la vitelogénesis, inviabilidad del número y función de los óvulos y alteraciones hormonales (Kime, 1995). También se ha visto que machos de ratas expuestos al MeP tuvieron alteraciones en la histología y fisiología de estructuras y órganos reproductivos como: testículos, epidídimos, próstata, ductos deferentes y vesícula seminal (Narayana et al., 2006).

Además de alteraciones en la reproducción y menor fecundidad, la exposición a contaminantes también afecta la calidad de los críos. En ranas de la especie *Xenopus laevis* se observaron que renacuajos expuestos a organofosforados tuvieron malformaciones congénitas en la región dorsal y ventral de sus colas cuando expuestos durante la etapa de desarrollo larval (Bonfanti et al., 2004).

Un ejemplo de cómo la exposición a concentraciones subletales puede afectar a la dinámica poblacional a largo plazo puede ser observado en una comunidad dulceacuícola de plancton, zooplancton e invertebrados acuáticos en California, USA. Después de expuestos al contaminante organofosforado hubo una reducción del tamaño poblacional de organismos plantónicos depredadores (*Notonectidae sp.*, *Dytiscidae sp.*, *Coenagrionidae sp.*, y larvas de *Hydrophilidae*) y de insectos

depredadores (*Corixidae*, *Baetidae* y adultos de *Hydrophilidae*). Los crustáceos presentes *Cyclops vernalis* y *Moina micrura* casi fueron extintos. Las poblaciones de insectos depredadores se recuperaron más lentamente que la de insectos herbívoros. Eso proporcionó un crecimiento de la población de insectos herbívoros lo que ocasionó un desequilibrio en el ecosistema. Los insectos herbívoros como: *Diaptomus pallidus*, *Ceriodaphnia sp.*, y especies de los géneros *Brachionus*, *Polyartha*, *Hexartha*, *Filinia* y *Tripleuchalanis*, que antes eran alimento de los crustáceos se reprodujeron descontroladamente ante la ausencia de sus depredadores. Sin embargo, *Asplanchna brightwelli* que era un depredador débil comparado con los crustáceos no se vio afectado de la misma forma. Era un depredador de rotíferos herbívoros y como único depredador su tamaño poblacional creció descontroladamente ocasionando la extinción de una de sus presas. Con la reducción de los rotíferos herbívoros el fitoplancton se dio abundantemente ocasionando la eutrofización del ambiente acuático (Hurlbert & Willson, 1972). Efectos similares fueron encontrados posteriormente en distintos organismos (Brink et al., 1995; Hoagland et al. 2009).

En este trabajo se indagaron las consecuencias en los parámetros demográficos y tamaños de poblaciones artificiales de *G. multiradiatus* debidas a la exposición al MeP a lo largo de cuatro generaciones. En particular, se evaluó la posibilidad de que la exposición al insecticida metil paratión-MeP, reduzca el tamaño de las poblaciones artificiales de *G. multiradiatus*.

Los parámetros demográficos analizados y las fórmulas utilizadas para calcularlos (Hinde, 1998) se encuentran explicados de forma detallada en el capítulo cuarto (ver 8.).

## **7.2. Objetivos**

Determinar los posibles efectos en los parámetros demográficos en poblaciones artificiales de *G. multiradiatus* expuestas a concentraciones subletales de MeP durante tres generaciones. Comparar entre el grupo control no expuesto y el grupo experimental expuesto a MeP los siguientes parámetros:

- El número total de individuos nacidos.
- La tasa de supervivencia de los individuos a 20 días.
- La tasa de mortalidad.
- La frecuencia de malformaciones congénitas.
- Las proporciones sexuales de juveniles y adultos en cada generación.
- El tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) en cada generación.
- Las fecundidades específicas en cada generación (por hembra y no por grupo).
- Proyecciones poblacionales en cada generación.

## **7.3 Hipótesis y predicciones**

La exposición de poblaciones al MeP a lo largo de las generaciones afecta los parámetros demográficos del pez *G. multiradiatus* entonces los individuos del grupo experimental expuestos al contaminante presentarán mayores tasas de mortalidad y frecuencia de malformaciones congénitas mientras que los individuos del grupo control presentarán una mayor tasa de supervivencia. Además, se espera que en proyecciones poblacionales hechas a partir de tablas de vida con datos reales, los valores de  $\lambda$  (tasa de crecimiento poblacional) sean mayores en el grupo control.

## **7.4 Métodos**

La observación y mantenimiento de las peceras tuvo una frecuencia mínima de tres veces a la semana y en las temporadas reproductivas la observación de las peceras fue diaria. Los individuos adultos fueron contabilizados semanalmente. A partir del

momento en que las hembras en estudio estaban preñadas, éstas fueron verificadas diariamente durante toda su gestación. Las hembras a punto de parir (se puede observar el tamaño de su abdomen y en algunos casos la cloaca dilatada) fueron separadas individualmente en maternidades.

Las maternidades son redes plásticas que tienen dos compartimentos, uno para la hembra y el otro para los críos. La hembra se posiciona en el menor de ellos que ocupa cerca de un octavo del total de la red. El tramado del compartimento de la hembra posibilita el libre acceso de los críos a su compartimento, sin embargo, la hembra no tiene acceso al compartimento de los críos. Así, los críos nacen en el compartimento de la hembra y posteriormente se ubican en su compartimento. De esta manera se contó el número de individuos nacidos provenientes de cada hembra y así se obtuvieron las fecundidades específicas por hembra.

El parto completo de las hembras puede tardar desde horas hasta días. En este período las hembras fueron observadas con intervalos máximos de diez horas hasta el término de su parto. Los críos fueron contados diariamente mientras fueron mantenidos en las maternidades durante un período de 20 días ( $\pm 5$  días). De este modo, fue posible observar la tasa de supervivencia de los críos y la frecuencia de críos con malformaciones congénitas.

El uso de maternidades posibilitó contabilizar el número exacto de individuos que nacieron así como su estado morfológico y su apariencia física general. El conteo fue realizado por dos observadores y en caso de que los valores encontrados fueran diferentes, se hizo un recuento.

La tasa de mortalidad de los individuos fue contemplada en todas las etapas de vida y utilizó el mismo método de conteo. La descomposición de los críos muertos ocurre rápidamente, lo que en algunos casos dificultó el conteo directo de fallecidos. En estos casos el conteo se dio de modo indirecto, es decir, se restó el último conteo de críos vivos con un conteo anterior y de este modo se calcularon las mortalidades no observadas. Después de los 20 días ( $\pm 5$  días) los individuos fueron retirados de las maternidades y puestos en peceras separados de sus progenitores. El uso de las

maternidades posibilitó el conteo del número de individuos nacidos, el número de supervivientes hasta 20 días ( $\pm 5$  días) y la tasa de mortalidad antes de ser liberados de las peceras. Posteriormente se continuó haciendo el conteo visual de los individuos en las peceras, lo que proporcionó el número de individuos que sobrevivieron a las etapas de juvenil y adulto. La mortalidad después de eso fue contemplada por pecera y no por maternidad.

Las clases de edad utilizadas para la tabla de vida fueron; nacidos, juveniles y adultos. Los nacidos fueron contabilizados después del parto. Los individuos fueron categorizados como juveniles al momento en que se hizo la completa identificación del género debido a su dimorfismo sexual (ver 1.1.1.). Los individuos fueron categorizados como adultos a partir del momento en que se observó la primera hembra preñada y así se cerraba el ciclo reproductivo de una generación.

Las proporciones sexuales de juveniles y adultos también se dieron por conteo directo en cada generación. No fue posible calcular la proporción sexual de los críos debido a la ausencia de caracteres fenotípicos que marcan el dimorfismo sexual antes de los 50 días de edad ( $\pm 15$  días).

El tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) fue calculado con la fórmula descrita en el capítulo cuarto, apartado 1.3.

Los parámetros demográficos fueron calculados a partir de la segunda generación. Esto es debido a que en sus cálculos es necesario hacer la comparación con generaciones anteriores y no se tuvieron los datos de la generación P. Sin esos datos no fue posible calcular los datos de la generación F1.

Los datos fueron normalizados (Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ ) por lo que los análisis estadísticos fueron hechos con pruebas paramétricas. Para comparar los efectos del tratamiento en los parámetros demográficos se hicieron análisis de varianza ANOVAs en el programa estadístico SPSS versión 15.

### 7.4.1. Proyecciones poblacionales

Para calcular las tasas de crecimiento poblacional y los rangos de confiabilidad de tablas de vida analizadas se utilizaron proyecciones poblacionales de remuestreo y aleatorización, respectivamente. Se calcularon tablas de vida de cada tratamiento en cada generación. Fueron contempladas cuatro etapas del ciclo de vida de *G.multiradiatus*: nacidos, sobrevivientes a veinte días, juveniles y adultos. La fecundidad utilizada para las tablas de vida fue calculada de acuerdo con la cantidad de hembras y sus respectivos críos en cada evento.

#### 7.4.1.1 Tasas de crecimiento poblacional. Primera proyección poblacional

El intervalo de confianza posible para cada  $\lambda$  de cada tratamiento (control y experimental), fue calculado con una tabla de vida en cada generación como se ejemplifica a continuación (ver Tabla 7.1).

Tabla.7.1 Ejemplo del cálculo de  $\lambda$  con tablas de vida del pez *Girardinichthys multiradiatus* F3, grupo experimental.

X (años)	Nx	lx	Mx	lxmx	xlxmx		
0	325	1	0	0	0	$Ro = \sum lxmx$	0.30
0.08	107	0.33	0	0	0	$T = \sum xlxmx / Ro$	0.33
0.16	47	0.14	0	0	0	$r = \ln Ro / T$	-3.64
0.33	46	0.14	2.13	0.30	0.10	$\lambda = e^r$	0.03

X= etapa de edad en años; Nx= número de individuos sobrevivientes a cada etapa; lx= supervivencia específica por edad; mx= tasa de fecundidad específica por edad determinada por conteo directo; Ro= tasa reproductiva neta; T= tiempo generacional; r= tasa intrínseca de crecimiento poblacional;  $\lambda$ = tasa finita de crecimiento poblacional.

Para conocer los intervalos de confianza posibles de las  $\lambda$ s en cada tratamiento y generación, fue realizado un remuestreo con reemplazo basado en datos reales. Esta proyección fue hecha debido a dos principales motivos: a) que el grupo control presenta un menor número de datos que el grupo experimental, resultado del menor número de peceras e individuos y b) que el total de individuos disminuye gradualmente en las generaciones, llegando a un número muy bajo en la cuarta generación. La proyección se realizó basada en un remuestreo de los datos reales con substitución, es decir, en un grupo con 20 datos se remuestrearon 20 nuevos datos pudiendo haber, por ejemplo,

la omisión del caso 5 y su substitución por el caso 1, que resultaba entonces repetido. Después se calculó otra vez la  $\lambda$  a partir de los datos del nuevo remuestreo. Este procedimiento se repitió mil veces en cada tratamiento en todas las generaciones. El resultado es la obtención de un intervalo de confianza o “*bootstrap confidence intervals*” de las posibles  $\lambda$  encontradas a partir de la  $\lambda$  real (Caswell, 2001).

#### 7.4.1.2. Rango de confiabilidad, segunda proyección poblacional

Para saber si las proyecciones poblacionales reflejan diferencias significativas entre los tratamientos fue realizada una segunda proyección poblacional con una prueba de aleatorización. Esto se logra calculando la diferencia entre los valores reales y los valores proyectados encontrados. Primeramente se calculó el valor real mediante el promedio del número de peces nacidos del grupo control y del grupo experimental. El valor real utilizado fue la resta de estos promedios. En seguida se hizo un remuestreo mezclando los datos del grupo control con los del grupo experimental simulando que son una única población. El objetivo fue verificar si el valor encontrado del grupo experimental es significativamente diferente del patrón encontrado en esta población simulada. Después se separaron los datos remuestreados de manera proporcional a la cantidad inicial de datos de cada grupo, es decir, si el grupo control aportó 20 datos y el experimental 40, se separan nuevos 20 datos remuestrados para el grupo control y 40 para el experimental. Este remuestreo se hizo sin la substitución de los datos, es decir, si había 60 datos, se utilizaron los 60 de manera reordenada, sin la repetición u omisión de ningún dato. Posteriormente, se sustrajo el valor calculado encontrado para el grupo “control” y para el grupo “experimental” y así se obtuvo la diferencia entre “falsos” tratamientos proyectados. Después se restó la diferencia real inicialmente calculada de la diferencia obtenida por el remuestreo. Este proceso se repitió mil veces para obtener un intervalo de las diferencias posibles considerando que los grupos fueran una única población y no difirieran por tratamiento. Este procedimiento se repitió en cada tratamiento en todas las generaciones (Caswell, 2001).

Finalmente se comparó la diferencia real, con el intervalo de las diferencias calculadas por los remuestreos. Si el valor encontrado está dentro del intervalo de confianza, la diferencia entre el grupo experimental y la población con los tratamientos mezclados no es significativa. Sin embargo, si la diferencia real no se encuentra dentro del intervalo de confianza, el tratamiento experimental es significativamente diferente de la población con tratamientos mezclados, es decir, el grupo expuesto al contaminante difiere significativamente (Caswell, 2001).

### 7.5 Resultados

El total de individuos nacidos, sobrevivientes, juveniles y adultos de cada grupo control (C) y experimental (E), en cada generación puede ser observado en la Tabla 7.1.

Tabla.7.1. Tabla general de individuos por tratamiento (C= control; E= experimental) en cada etapa de vida y en todas las generaciones en el pez *Girardinichthys multiradiatus*.

Generación	Nacidos		Supervivientes a 20 días		Juveniles		Adultos	
	C	E	C	E	C	E	C	E
F1	244		173					
	81	163	58	115				
Machos					21	37	14	23
Hembras					33	60	34	44
F2	305	543	197	265				
Machos					7	18	7	11
Hembras					16	40	14	35
F3	64	325	47	107				
Machos					8	17	8	16
Hembras					14	30	12	30
F4	18	64	13	21				
Machos					3	4	2	2
Hembras					6	10	6	8

F1= primera generación; F2= segunda generación; F3= tercera generación; F4=cuarta generación.

## 1. INDIVIDUOS NACIDOS

El promedio total de individuos nacidos por maternidad en todas las generaciones fue menor en el grupo control que el promedio de nacidos en el grupo experimental, sin embargo la diferencia no fue significativa (ver Fig. 7.1. Valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y  $F$  y  $p$  en Tabla 11.5 en Anexos).

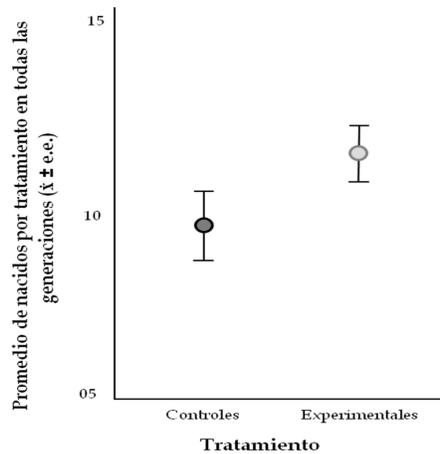


Fig. 7.1 Promedio de individuos nacidos en todas las generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

Haciendo los análisis separadamente por generación, se encontró que en la segunda generación el promedio de nacidos del grupo control fue similar al del grupo experimental. En esta generación la diferencia del promedio de nacidos no fue significativa. La diferencia entre el promedio de nacidos fue mayor entre tratamientos en la tercera generación, sin embargo, tampoco fue significativa. La cuarta y última generación siguió el mismo patrón. La diferencia tampoco fue significativa en esta generación (ver Fig. 7.2. Valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y  $F$  y  $p$  en Tabla 11.5 en Anexos).

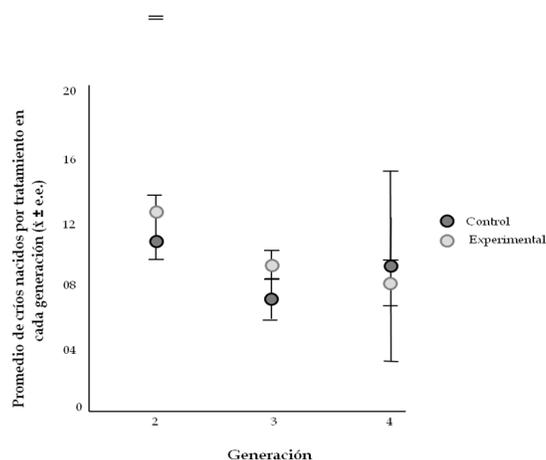


Fig. 7.2. Promedio de individuos nacidos en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

## 2. SUPERVIVENCIA

El promedio total de la supervivencia hasta los 20 días de edad ( $\pm 5$  días) de individuos nacidos en cada maternidad fue mayor en el grupo control que en el grupo experimental, sin embargo, la diferencia no fue significativa (ver valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y  $F$  y  $p$  en Tabla 11.5 y Fig. 11.7.1 en Anexos). En los análisis por generación, se encontró que en la segunda generación el promedio de la supervivencia de los individuos del grupo control fue similar al del grupo experimental por lo que la diferencia tampoco fue significativa. En la tercera generación el promedio del grupo control fue mayor que del grupo experimental, pero la diferencia tampoco es significativa. En la cuarta generación el error estándar es muy elevado tampoco permite una diferencia significativa (ver valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y  $F$  y  $p$  en Tabla 11.5 y Fig. 11.7.2 en Anexos).

Sin embargo, el número total de peceras es mayor en el grupo experimental que en el control, y por consiguiente el de hembras preñadas. Esto conlleva a calcular la supervivencia de los individuos a través de la proporción de individuos que sobrevivieron del monto total de individuos nacidos. Calculando la proporción total de individuos supervivientes en todas las generaciones, el grupo control presentó un promedio de  $\bar{x}=0.633$ ,  $e.e.=0.054$ ,  $N=40$  mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.377$ ,  $e.e.=0.040$ ,  $N=80$ . En este caso en que se comparó la

proporción de la supervivencia de los individuos, la diferencia entre los tratamientos fue significativa ( $F_{1, 118}=14.373$ ,  $p<0.001$ ; ver Fig. 7.3.).

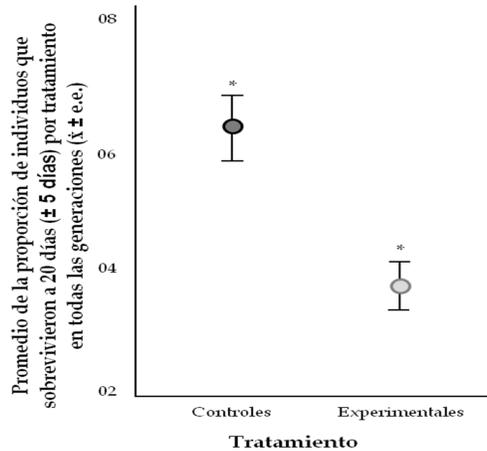


Fig.7.3. Promedio de supervivencia de críos proporcional al número de individuos en todas las generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

Haciendo los análisis de la proporción de supervivientes separadamente por generación, se observó que en la segunda generación el promedio de la supervivencia de los individuos del grupo control fue de  $\bar{x}=0.564$ , e.e.= 0.674, N=29 y del grupo experimental de  $\bar{x}=0.449$ , e.e.= 0.583 N=42. En esta generación la diferencia en la supervivencia no fue significativa ( $F_{1, 69}=1.634$ ,  $p= 0.205$ ). En la tercera generación el promedio de supervivencia del grupo control fue de  $\bar{x}=0.810$ , e.e.= 0.063, N=9 y del grupo experimental de  $\bar{x}=0.317$ , e.e.= 0.060, N=30. La diferencia entre tratamientos en esta generación es significativa ( $F_{1, 37}=18.672$ ,  $p<0.0001$ ). La diferencia entre las proporciones del número de individuos supervivientes es mayor entre tratamientos en la cuarta generación. El grupo control tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.833$ , e.e.= 0.167, N=2 mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.238$ , e.e.= 0.082, N=8. La diferencia entre tratamientos también es significativa en esta generación ( $F_{1, 8}=10.416$ ,  $p<0.05$ ; ver Fig. 7.4.).

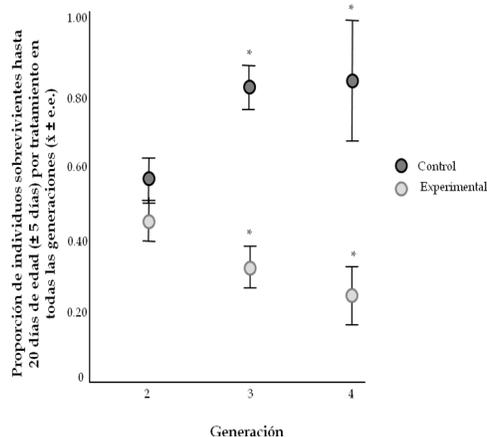


Fig.7.4 Promedio de supervivencia de crías proporcional al número de individuos en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

### 3. MORTALIDAD

El promedio total de la mortalidad de los individuos fue mayor en el grupo experimental que en el grupo control ( $\bar{x}=6.74$ , e.e.= 0.598, N=80;  $\bar{x}=3.25$ , e.e= 0.487, N=40, respectivamente) en todas las generaciones y la diferencia entre tratamientos fue significativa ( $F_{1, 118}=14.547$ ,  $p<0.001$ ; ver valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y F y p en Tabla 11.5, Fig.11.7.3 en Anexos).

En los análisis por generación, se encontró que en la segunda generación el promedio de la supervivencia de los individuos del grupo control fue de  $\bar{x}=3.724$ , e.e.=0.610, N=29 y del grupo experimental de  $\bar{x}=4.752$ , e.e.=0.924, N=42. Esta diferencia de mortalidad entre individuos fue significativa ( $F_{1, 69}=5.593$ ,  $p<0.005$ ) en esta generación. La diferencia entre la mortalidad de individuos es mayor entre tratamientos en la tercera generación. En esta generación el promedio del grupo control fue de  $\bar{x}=1.889$ , e.e.= 0.655, N=9 y del grupo experimental de  $\bar{x}=7.267$ , e.e.=0.915, N=30. La diferencia también fue significativa ( $F_{1, 37}=3.747$ ,  $p= 0.061$ ) en la tercera generación. En la cuarta generación el grupo control tuvo un promedio de  $\bar{x}=2.500$ , e.e.=1.500, N=2 mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=5.375$ , e.e.=0.822, N=8. La

diferencia sin embargo, no es significativa en esta generación ( $F_{1, 8}=2.100$ ,  $p= 0.185$ ; ver valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y  $F$  y  $p$  en Tabla 11.5 y Fig. 11.7.4 en Anexos).

Sin embargo, así como para la supervivencia de los individuos, la mejor manera de comparar la mortalidad de los individuos en cada tratamiento es por medio de la proporción de individuos muertos entre el total de individuos nacidos. La proporción de mortalidad de los individuos por tratamiento encontrada en todas las generaciones en el grupo control fue de  $\bar{x}=0.367$ ,  $e.e.=0.054$ ,  $N=40$  mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.623$ ,  $e.e.=0.040$ ,  $N=80$ . En este caso en que se comparó la proporción de la mortalidad de los individuos, la diferencia entre los tratamientos fue significativa ( $F_{1, 118}=14.373$ ,  $p<0.001$ ; ver Fig. 7.5.).

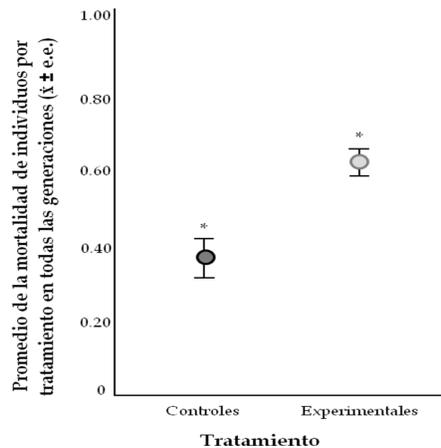


Fig.7.5 Promedio de mortalidad de críos proporcional al número de individuos en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

En los análisis de la proporción de muertos por generación, se encontró que en la segunda generación el promedio de la supervivencia de los individuos del grupo control fue de  $\bar{x}=0.436$ ,  $e.e.= 0.674$ ,  $N=29$  y del grupo experimental de  $\bar{x}=0.551$ ,  $e.e.= 0.583$   $N=42$ . En esta generación la diferencia de la supervivencia de nacidos no fue significativa ( $F_{1, 69}=1.634$ ,  $p= 0.205$ ). En la tercera generación el promedio de mortalidad del grupo control fue de  $\bar{x}=0.190$ ,  $e.e.= 0.062$ ,  $N=9$  y del grupo experimental de  $\bar{x}=0.688$ ,  $e.e.= 0.060$ ,  $N=30$ . La diferencia entre tratamientos en esta generación fue significativa

( $F_{1, 37}=18.672$ ,  $p<0.0001$ ). En la cuarta generación el grupo control tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.167$ , e.e.= 0.167, N=2 mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.762$ , e.e.= 0.082, N=8. La diferencia entre tratamientos también fue significativa en esta generación ( $F_{1, 8}=10.416$ ,  $p<0.05$ ; ver Fig 7.6.).

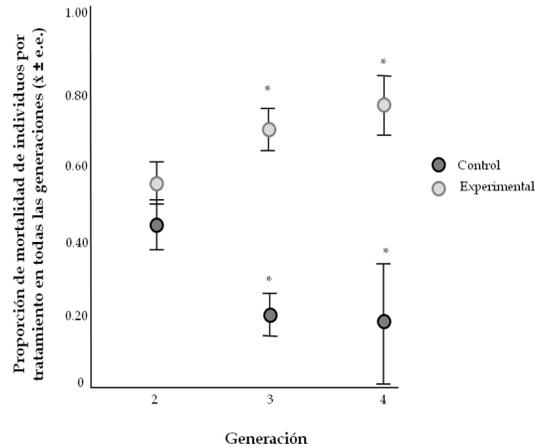


Fig.7.6. Promedio de mortalidad de críos proporcional al número de individuos en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

#### 4. MALFORMACIONES CONGÉNITAS

El promedio total de la frecuencia de individuos que presentaron algún tipo de malformación congénita fue mayor en el grupo experimental que en el grupo control ( $\bar{x}=1.512$ , e.e.= 0.270, N=80;  $\bar{x}=0.38$ , e.e.= 0.151, N=40, respectivamente) en todas las generaciones y la diferencia entre tratamientos fue significativa ( $F_{1, 118}=8.186$ ,  $p<0.005$ ; ver valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y F y p en Tabla 11.5 y Fig. 11.7.5 en Anexos).

Comparando los promedios de malformaciones separadamente por generación, se observó que en la segunda generación el promedio de los individuos del grupo control fue de  $\bar{x}=0.414$ , e.e.=0.955, N=29 y del grupo experimental de  $\bar{x}=1.619$ , e.e.=0.428, N=42. Esta diferencia de mortalidad entre individuos fue significativa ( $F_{1, 69}=4.956$ ,  $p<0.005$ ) en esta generación. En la tercera generación el promedio de malformaciones del grupo control fue de  $\bar{x}=0.222$ , e.e.= 0.022, N=9 y del grupo

experimental de  $\bar{x}=1.00$ , e.e.=0.299, N=30. La diferencia sin embargo, no fue significativa ( $F_{1, 37}=1.900$ ,  $p= 0.176$ ) en la tercera generación. La diferencia de la frecuencia de individuos con malformaciones es mayor entre tratamientos en la cuarta generación. En esta generación el grupo control tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.500$ , e.e.=0.500, N=2 mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=2.875$ , e.e.=2.532, N=8. La diferencia sin embargo, tampoco es significativa en esta generación ( $F_{1, 8}=1.591$ ,  $p= 0.247$ ; ver valores  $\bar{x} \pm e.e.$  y F y p en Tabla 11.5 y Fig. 11.7.6 en Anexos).

Así como en el caso para calcular la supervivencia de los individuos y la mortalidad, la mejor manera de comparar la frecuencia de malformaciones congénitas en los individuos en cada tratamiento es por medio de la proporción de individuos con malformaciones entre el total de individuos nacidos. La proporción de malformaciones de los individuos por tratamiento encontrada en todas las generaciones para el grupo control fue de  $\bar{x}=0.026$ , e.e.=0.001, N=40 mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.131$ , e.e.=0.022, N=80. En este caso en que se comparó la proporción de la frecuencia de individuos con malformaciones, la diferencia entre los tratamientos fue significativa ( $F_{1, 118}=10.443$ ,  $p<0.001$ ; ver Fig. 7.7).

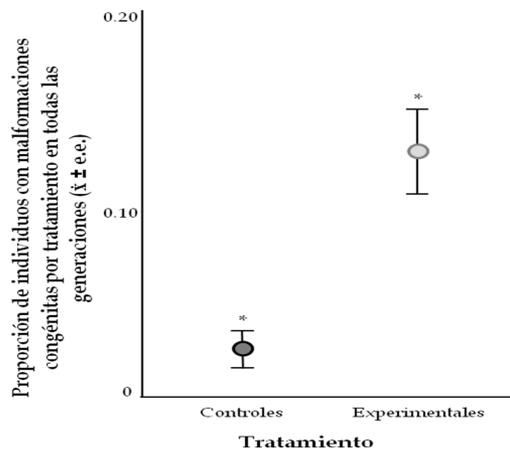


Fig. 7.7. Proporción de críos nacidos con malformaciones congénitas proporcional al número de individuos nacidos por tratamiento en todas las generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

Haciendo los análisis de la proporción de malformaciones congénitas en los individuos separadamente por generación, se encontró que en la segunda generación el promedio de los individuos del grupo control fue de  $\bar{x}=0.026$ , e.e.= 0.011, N=29 y del grupo experimental de  $\bar{x}=0.118$ , e.e.= 0.028 N=42. En esta generación la diferencia de la supervivencia de nacidos fue significativa ( $F_{1, 69}=6.775$ ,  $p < 0.05$ ). En la tercera generación el promedio de mortalidad del grupo control fue de  $\bar{x}=0.247$ , e.e.= 0.025, N=9 y del grupo experimental de  $\bar{x}=0.867$ , e.e.= 0.026, N=30. La diferencia entre tratamientos en esta generación también es significativa ( $F_{1, 37}=15.462$ ,  $p < 0.05$ ). En la cuarta generación el grupo control tuvo un promedio de  $\bar{x}=0.500$ , e.e.= 0.050, N=2 mientras que el grupo experimental tuvo un promedio de  $\bar{x}=2.875$ , e.e.= 0.895, N=8. La diferencia entre tratamientos también es significativa en esta generación ( $F_{1, 8}=1432.684$ ,  $p=0.000$ ; ver Fig. 7.8.).

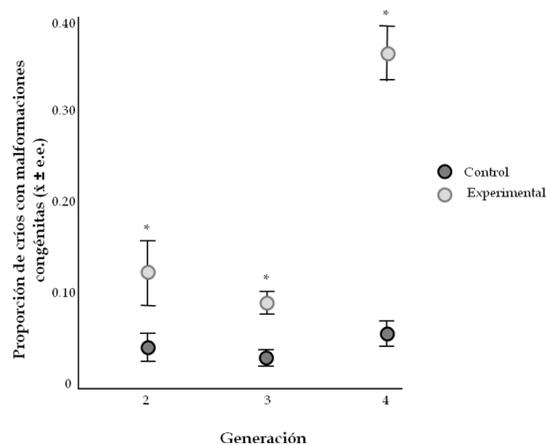


Fig. 7.8. Proporción de críos nacidos con malformaciones congénitas proporcional al número de individuos nacidos en tres generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

## 5. PROPORCIÓN SEXUAL

La proporción Sexual (Machos: Hembras  $N_m / N_m + N_h$ , donde  $N_m$ = número de machos y  $N_h$ = número de hembras) encontrada en las generaciones de *G. multiradiatus* fue similar a la encontrada por Arellano-Aguilar & Macías García, 2009 (ver 1.1.1 y Tabla 7.2.).

Tabla.7.2. Proporciones sexuales encontradas (Machos: Hembras Nm/ Nm+Nh, donde Nm= número de machos y Nh= número de hembras) y los porcentajes de machos para juveniles y adultos en cuatro generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

Generación	Tratamiento	Juveniles	Adultos	Juveniles	Adultos
F 1	C	0.4:1	0.3:1	39%	29%
	E	0.4:1	0.3:1	38%	34%
F 2	C	0.3:1	0.3:1	30%	33%
	E	0.3:1	0.2:3	31%	24%
F 3	C	0.4:1	0.4:1	36%	40%
	E	0.4:1	0.4:1	36%	35%
F 4	C	0.3:1	0.2:1	33%	25%
	E	0.3:1	0.2:1	29%	20%

Las diferencias en las proporciones sexuales totales no fueron significativas entre los grupos control o experimental ( $F_{1,14} = 0.622$ ,  $p = 0.443$ ). Tampoco la diferencia dada por el tratamiento entre juveniles ( $F_{1,6} = 0.122$ ,  $p = 0.738$ ), ni en adultos ( $F_{1,6} = 0.511$ ,  $p = 0.501$ ).

## 6. TAMAÑO POBLACIONAL EFECTIVO -Ne

El tamaño poblacional efectivo (Ne) normalmente es menor que el número total (Nt) de individuos. Nuestro presentó el mismo patrón ( ver Tabla 7.3.);

Tabla. 7.3. Valores comparativos del número de individuos total-Nt con el número efectivo poblacional-Ne en cuatro generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

Generación	Tratamiento	Nt	Ne
F 1	C	48	40
	E	67	60
F 2	C	21	19
	E	46	33
F 3	C	20	19
	E	46	42
F 4	C	4	4
	E	8	6

## 7. FECUNDIDAD

Las fecundidades encontradas para cada tratamiento y en cada generación se pueden observar a continuación en la Tabla 7.4.

Tabla. 7.4. Fecundidades encontradas para hembras de cada grupo en cuatro generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

G	Tratamiento		N	F	p	g.l
	Control	Experimental				
F1	6.45 ± 0.88	8.55 ± 0.75	109	3.05	0.08	167
F2	8.97 ± 1.23	12.34 ± 1.23	44	3.62	0.07	76
F3	4.57 ± 1.24	7.29 ± 1.06	35	5.48	0.06	47
F4	1.50 ± 1.25	2.13 ± 0.76	30	0.19	0.66	40

En ninguna generación hubo diferencias significativas entre la fecundidad de las hembras debido al tratamiento.

## 8. PROYECCIONES POBLACIONALES

### 1. Tasas de crecimiento poblacional. Primera proyección poblacional

Los intervalos de confianza de las  $\lambda$  calculados por remuestreo en la primera proyección poblacional resultaron muy elevados por lo que no permiten observar diferencias (ver Fig .9).

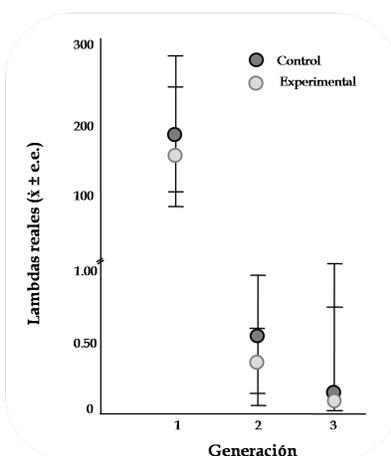


Fig.7.9.  $\lambda$  encontradas a partir de datos reales en proyecciones poblacionales para cada grupo en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

## 2- Rango de confiabilidad. Segunda proyección poblacional

Se calculó el rango de confiabilidad de las proyecciones de  $\lambda$  para observar si el valor de  $\lambda$  del grupo experimental difería del rango de  $\lambda$  normal para las poblaciones de *G. multiradiatus* (ver Fig. 7.10).

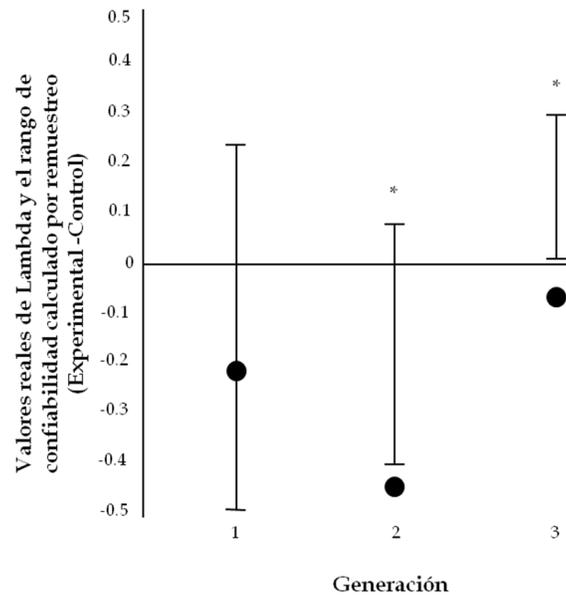


Fig. 7.10. Rango de confiabilidad de  $\lambda$  en tres generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*. Los valores fuera del rango indican que la  $\lambda$  del grupo experimental es significativamente diferente del rango esperado. En F2 y F3 los valores de  $\lambda$  del grupo experimental son menores a lo esperado.

En la primera generación (F1) el valor de  $\lambda$  del grupo experimental se encuentra dentro del rango posible de  $\lambda$ . Sin embargo, en las generaciones segunda F2 y tercera F3, el valor de  $\lambda$  se encuentra fuera del rango. Eso indica que el valor de  $\lambda$  del grupo experimental en F2 y F3 es menor que el rango esperable de  $\lambda$  para poblaciones normales. Esto confirma que la exposición al plaguicida MeP afecta el crecimiento de la población resultando en una menor tasa de crecimiento poblacional.

## **7.6 Conclusiones**

Las hembras experimentales tendieron a tener una mayor cantidad de críos, sin embargo, la mortalidad de sus críos fue significativamente mayor en las generaciones F3 y F4. Se podría especular que generaciones de críos de baja calidad intra-ovario resulta en camadas grandes pero con altas tasas de mortalidades post-parto.

Por otro lado, en los capítulos anteriores, los efectos de la exposición al contaminante MeP sólo se dieron a partir de la segunda generación. Se observó que la mortalidad y la frecuencia de críos con malformaciones aumentan gradualmente a cada generación, siendo la diferencia significativa a partir de la segunda generación F2. Cabe recordar la diferencia entre los momentos de exposición al contaminante en F1, donde los individuos expuestos eran adultos, y en F2 y F3 cuando los individuos expuestos eran embriones. Además, la tasa baja de  $\lambda$  y alta incidencia de malformaciones en la tercera generación (F3) sugiere que el escape (adaptativo) a las concentraciones subletales del MeP es poco probable.

En este estudio se observó que a pesar de que las proyecciones poblacionales presentaron valores de tasas de crecimiento poblacional con intervalos de confianza sobrelapados, los valores de  $\lambda$  para el grupo experimental son menores que el rango de confiabilidad para las poblaciones en F2 y F3. Esto indica que poblaciones de *G. multiradiatus* expuestas a plaguicidas organofosforados tienden a decrecer su tamaño poblacional lo que puede resultar en una disminución del número efectivo de individuos en las poblaciones y en la especie como tal.

## Capítulo cuarto

# Organophosphorous Pesticides Exacerbate the Demographic Consequences of Intersexual Selection in Fish

Irene BarbosaValero<sup>1</sup>, Omar Arellano-Aguilar<sup>2</sup> and Constantino Macías García<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM, Departamento de Ecología Evolutiva <sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental  
México.

<sup>3</sup> Author for correspondence

## 1. Introduction

In the last 150 years, the human population has increased very rapidly in part due to the generalised use of agrochemicals, which enabled the development of intensive farming of food crops. Large monocultures are particularly vulnerable to pests, thus pesticides became widely used since the 1930's to aid producing larger crops. However, within a few decades the collateral negative effects of pesticides on the environment became apparent (Nimmo & McEwen, 1994). The first paper on adverse effects of pesticides was published in the early 1940's, but it was not until the 1960s that the Rachel Carsons review showed strong evidence of the environmental risk from the use of pesticides, particularly organochlorines such as the DDT (Nimmo & McEwen, 1994). This led to the search for alternatives, and in recent decades the organophosphorous (OPs) pesticides have become more used due to their short persistence in the environment and their high toxicity. These are lipophilic substances that penetrate through skin, and depending on their chemical structure are divided into phosphorotiates (e.g. methyl parathion, parathion, diazinon) and phosphorodithioates (e.g. malathion, dimetoate and azinfosmethyl). The biotransformation and activation pathways of OPs have been extensively reviewed (Jokanović, 2001). Mainly, OPs interfere with transmission of nerve impulses as they inhibit the activity of serine esterases, particularly the catalytic activity of acetylcholinesterase (AChE). The chemical reactions occur largely in the liver, where the OP thioether group is oxidized to the *oxon* metabolite (P=S→P=O) by the action of cytochrome P450 monooxygenases. After this biotransformation the OPs can bioaccumulate, or they can become immediately toxic. Because of their chemical affinity, OPs bioaccumulate in adipose tissues, muscle, glands, gonads and organs such as the liver, kidneys and brain (Vittozzi et al., 2001). Fatty tissue stores both the original form and the *oxon* metabolites. This process reduces the concentrations of free OPs in blood, yet during periods of starvation or stress, when stored fat is mobilized to supply metabolic energy, the OPs are released, leading to re-intoxication (Jokanović, 2001). Toxicity itself can occur in two ways: inhibition of acetylcholinesterase, and citotoxic effects on immune cells (Vittozzi et al., 2001). Inhibition of AChE occurs through the interaction between P=O and the serine hydroxyl group at the enzyme's active site. As AChE, is responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (which stimulates postsynaptic response in the nervous systems and in the neuromuscular junction; Jokanović, 2001), the enzymes inactivation disrupts the action of the nervous and neuromotor systems. Citotoxicity is the result of oxidative desulphuration of OPs in which free radicals or reactive oxygen species (ROS) are released. Li (2007) proposed this mechanism because OPs affect directly the immune system by citotoxicity on T-lymphocytes. Moreover, the high concentration of free radicals and ROS produces protein and lipid oxidation, resulting in damage to cell membranes or even DNA.

Organophosphorous pesticides cause several physiological effects –characterised by a diversity of symptoms-

depending on time exposure and chemical concentration. Pesticides act at molecular level within the organisms, yet these interactions can lead to a cascade of effects, from the biochemical through the organism, the population, and up to the ecosystem levels (Walker et al., 2006; Fig. 1.). The physiological effects of OPs have been severally described. They can cause neurotoxic damage by AChE inhibition as shown in the mosquitofish (*Gambusia affinis*; Boone & Chambers, 1996), induce chromosome aberrations such as those observed in the green chromide (*Etilopius suratensis*), a cichlid fish from India and Sri Lanka (Das & John, 1999), and compromise growth and neural development in mammals (e.g. Abu-Qare et al., 2000). Citotoxic effects and damage to organs such as liver, intestine and gills have also been reported (Fanta et al., 2003), and can lead to reduced behavioural performance. In developing organism, exposure can result in a failure to attain normal weight and in reduced nestling survival (as in nestling European starlings *Sturnus vulgaris*; Parker & Goldstein, 2000).

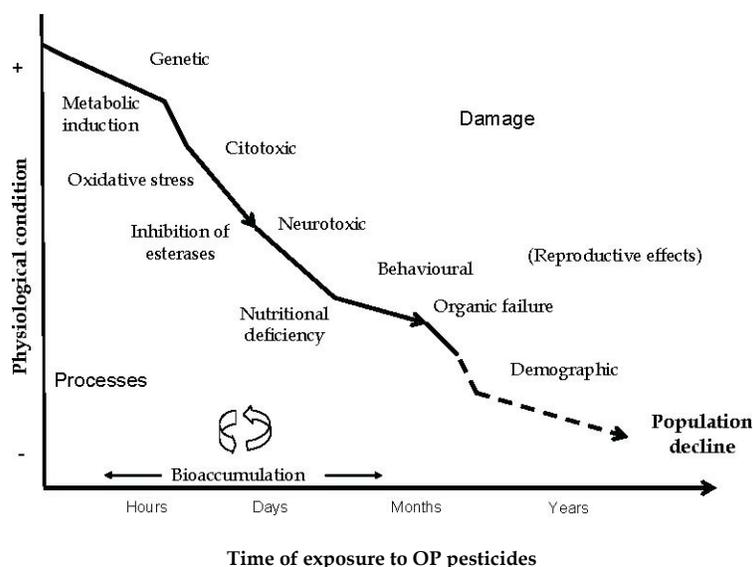


Fig. 1. Acute or chronic exposure to organophosphorous pesticides induces metabolic changes that produce a cascade of effects in the complete organism; depending on the duration of the exposure and on the pesticide concentration, the physiological condition of the exposed organisms decreases and can lead to population decline.

Perhaps the most visible effects of sub-lethal intoxication with OPs are, at the individual level, changes in the normal behaviour (see Welsh & Hanselka, 1972 and Castillo et al., 2002 for early and recent reports respectively); and, at the population level, demographic decline such as that reported by Sarma et al. (2001) for a rotifer population whose growth rate declined following continuous OP exposure. Although both the general mechanisms of action of OPs and their acute effects are well known, little has been documented on the consequences of sub-lethal concentrations and of chronic exposure. By definition, these processes would have less obvious effects than chronic/acute exposure and may only become apparent in the long run at the demographic level. Here we show evidence of such subtle effects; we deal particularly with a behavioural-ecological process -sexual selection- which is likely to be disturbed by sub-lethal exposure. In species in which male mating success depends on the production and display of costly ornaments and reproductive behaviours, the exposure to insecticides, organophosphorous or otherwise, may lead to scarcity of attractive males and thus to a reduction of the population size.

### 1.1 Sub-lethal exposure and behaviour

Behaviour is an aspect of the phenotype which integrates processes occurring at various levels, from cell receptors to neuromotor mechanisms, into coordinated responses whose ultimate function is to promote the individual's fitness. It is this integrative nature that has led several authors to propose that behaviour can be used to detect environmental

changes in nature, such as those promoted by human activities. For instance, Little (1990) indicated that behaviour provides a “unique toxicological perspective”, because it bridges the gap between the biochemical approach traditionally favoured in toxicology, and the ecological consequences of pollution. This view was more recently repeated by Walker et al. (2006) who mentioned that behaviour represents the diversity of biochemical and physiological processes. Indeed, being a biologically meaningful response, behaviour provides ecological realism to our assessments of anthropogenic impact in nature. The term “behaviour” encompasses a very large amount of diverse phenomena. It includes 1) events which are mostly reactive, such as tropisms (the translation of one organism towards an attractant like sugar or light), predator avoidance, breathing (e.g. the opercular movements of fish, whose rhythm is partly determined by oxygen concentration in the water), panting and other simple thermoregulatory activities, etc. It also includes 2) more pro-active activities such as foraging (active search for food using endogenous rules, rather than merely responding to external stimuli), building of nests and other structures (an activity that also requires endogenous drives) or courtship displays, whose orientation and timing may be determined by external stimuli, but which follow endogenous rules that are in many cases completely unrelated to the immediate environmental conditions (see Baerends 1976; Lenher, 1996). The first, more “automatic” reactive behaviours are normally simple in structure, relatively invariant within species or populations, and easy to record. Also, the performance of those simple behaviours is often rather directly related to the organism's condition (e.g. a physiologically impaired animal would display more sluggish escape reactions than a healthy individual). It is therefore clear why behavioural toxicology relies heavily behaviours belonging to this category, particularly when dealing with acute/chronic exposure. By contrast, behaviours in the second category are usually complex in nature, quite variable between individuals and populations, and consequently difficult to record in a standardised manner. Nevertheless, it is these behaviours that are often more closely related to important components of the species' life histories. During acute exposure pro-active behaviours are unlikely to express themselves, and thus would be of no use to the toxicological research. Yet organisms exposed to sub-lethal intoxication would still display e.g. pro-active foraging or courtship, albeit not with the vigour, frequency or efficacy as non-exposed organisms. Other, less obvious but equally insidious effects of pollutants on proactive behaviours may include interference with intra-specific recognition (e.g. Fisher et al., 2006) or abnormal sexual performance through disrupting hormonal balance (Toft et al., 2003; see Markman et al., 2008 for an example where male performance is enhanced). It is in this context that recording the expression of such behaviours can alert of potentially negative consequences of exposure to natural populations. We shall review in the following sections the effects of pollutants on behavioural performance and their implications at a demographic level. The chemical industry has produced more than 500 compounds known to cause behavioural toxicity, which are classified as narcotics, excitatory agents, biochemical disruptors, cholinesterase inhibitors, reactive chemicals, central nervous system seizure agents and endocrine disruptors (details in Barron, 2002). The effects that have been associated with these chemicals include hyperactivity syndrome, paralysis, loss of coordination, tremors, ataxia, irritant responses, lethargy, etc., (Barron, 2002). Most of these effects have been observed following acute exposure or at high concentrations, and as mentioned above, all involve simple, automatic behaviours. To date, only a few studies have systematically investigated the behavioural consequences of exposure to sub-lethal concentrations. This is probably because the dominant paradigm in toxicology has been the dose-effect curve and the LC<sub>50</sub> value, calculated as the concentration at which 50% of exposed individuals die. It is obvious that studying the consequences of exposure to LC<sub>50</sub> provides an objective, repeatable experimental condition that can be compared across studies and has a clear definition. Yet before dying, the organisms experience different states of intoxication, by definition all deemed “sub-lethal”, which differ in their symptoms and in their biological significance. Walker (1998) conceptualized the dose-effect curve as a function with hypothetical limits that represent biological responses. Between the hypothetical limits “c” (where compensatory mechanism can arrest the onset of overt disease) and “r” (beyond which repair mechanisms cannot longer prevent pathological damage), the behavioural symptoms enlisted above can be observed and are linked with impaired physiology and pathological damage (Fig. 2). However, there are less obvious behavioural modifications that are not necessarily directly linked to neurotoxicity. For example, as part of the M74 syndrome characterised by high mortality of salmon (*Salmo salar*) fry in the Baltic Sea (recorded between 1974 and 1993 and possibly brought about by exposure to organochlorine pesticides), both female and male adult fish showed abnormal swimming behaviour and general lethargy. During the early stages, fish showed anoxia, low levels of carotenoids and antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol and ubiquinone (Börjesson & Norrgren, 1997). In addition, Baltic salmon presented induction of catalytic activity of cytochrome P450 enzymes and low levels of thiamine, which produced oxidative stress and “deficient behaviour”. Although in cases such as that of the M74 syndrome the link between behavioural and physiological impairment is evident, it is still debated whether animal behaviour is a useful parameter to incorporate in toxicological tests. The main arguments against are that field observations are difficult to quantify and that the best studies are focused on behaviours that are of little ecological relevance (Walker et al., 2006). The first criticism is easily rebutted, as it can be overcome with improved recording methods (including new remote-sensing technologies). The second argument highlights the need to identify those

relevant behaviours which are likely to be affected by sub-lethal exposure and to influence fitness. As we saw above, complex, pro-active behaviours such as foraging and courtship are good candidates to unmask biologically relevant effects of sub-lethal exposure in natural populations.

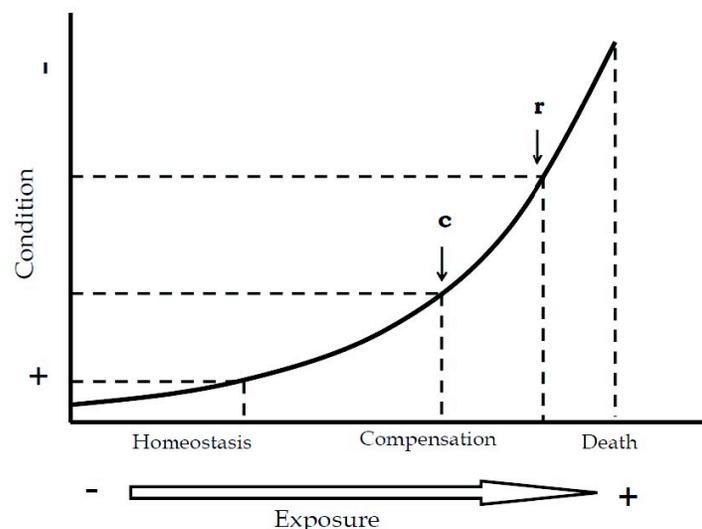


Fig. 2. The majority of behavioural changes registered during chemical exposure occur between “c” and “r”, which define the conditions where disease can be fought and pathological damage averted by compensatory and repair mechanisms (modified from Walker, 1998).

## 1.2 Sub-lethal exposure of OPs and intersexual selection

There is a recent trend to look into the effects of pollutant exposure on animal behaviour. Particular attention have received organophosphorous pesticides because these are neurotoxic and lipophilic chemicals which inhibit acetylcholinesterase (AChE) catalytic activity and detrimentally affect the expression of behaviour (see above). Their reputedly short persistence in nature and their high toxicity were the reasons why OPs substituted in the last decades the organochlorine pesticides formerly used in agriculture. We have learned that OPs can persist at low concentrations for more than 200 days in freshwater ecosystems (Bonderenko & Gan, 2004). This is a short persistence in nature compared to the decades of the DDT half life, but even if present for only a few days, OPs become available for- and are incorporated (bioaccumulate) into aquatic fauna (De la Vega-Salazar et al., 1997), often with adverse consequences. One obvious way in which behaviour is influenced by pesticides is through their teratological effects during embryogenesis. For instance, malformations produced by sublethal exposure to OP during embryonic development also cause deficient swimming (Bonfanti et al., 2004; Arellano-Aguilar & Macías Garcia, 2009). Pesticides can also have direct adverse effects on swimming behaviour when these interact with AChE activity, as is the case of OPs, or when they interfere with other and physiological processes (see Jones & Reynolds, 1997). For instance, Boone & Chambers (1996) demonstrated that more than 70% of AChE activity is inhibited in the mosquitofish (*Gambusia affinis*) between 4 and 12 hr after sub-lethal exposure to OP pesticides such as methyl parathion (8 µg/ml concentration), chlorpyrifos (0.1 µg/ml) and parathion (0.1 µg/ml), and the physiological damage was accompanied by abnormal swimming behaviour. In fact, behavioural damage can become evident as quickly as the earliest symptoms of physiological damage. For instance, in the armoured catfish *Corydoras paleatus*, gill damage is evident one hour after exposure to 0.083 µg/g of methyl parathion, coinciding with the onset of a decrease in swimming activity that reaches between 30% and 40% three days later. Damage to the intestine and liver tissues becomes apparent only after four hours of exposure (Fanta et al., 2003). It is clear that a reduced motor performance can influence survival, yet in most cases it happens only after long-term exposure or following acute intoxication. More

subtle behavioural effects are likely to follow sub-lethal exposure. We expect that organisms exposed to low concentrations of OPs will be more vulnerable to predation and their foraging behaviour will be sub-optimal. Another hypothesis is that OPs should interfere with mating behaviour. Surprisingly, in spite of having been proposed more than a decade ago (Jones & Reynolds, 1997), this possibility has seldom been investigated. In the following sections we present some recent results of our research on the links between exposure to insecticides and sexual performance. First we review the basic concepts relating sexual displays, ornamentation, male condition and female mate choice. Charles Darwin (1871) developed the concept of intersexual selection (normally female choice) to explain the existence of structures in the males that appear to defy natural selection. Three mechanisms have been proposed to explain why ornaments can evolve through female choice: direct benefits, indirect benefits, and exploitation of female sensory biases (see review in Andersson 1994). Males may advertise with the quality of their ornaments their capacity to provide direct benefits to females such as food, nutrients, parental care or good territory. The term "indirect benefits" refers to two different processes: runaway sexual selection (Fisher, 1930), and handicap (Zahavi, 1975) or "good genes" (Andersson in 1994). The handicap mechanism proposes that phenotypic quality is to some extent based on genetic variants which correlate with the expression of secondary sexual characters. The runaway model proposes that the genes responsible for the production of the ornaments and those responsible for the female preferences are jointly inherited, although their phenotypic effects are sex-linked. According to this model it is not necessary that the genes responsible for the ornaments affect survival or fecundity (Futuyma, 1998). In the case of "indicator mechanism," the attractive male traits reflect genetic/health condition (condition-dependent indicator models) and are preferred by the females because they provide genetic benefits for her offspring. Thus, male traits correlate positively with male fitness (Andersson & Simmons, 2006). Finally, the sensory bias mechanism proposes that females are particularly responsive to certain attributes of the environment, for instance food items, which are imitated by the male ornaments (Andersson & Simmons, 2006). Of course, these mechanisms are not mutually exclusive. The environment normally plays a significant role in the outcome of mate choice. This is in part because ornaments can evolve to signal male genetic or environmental quality (or both; Cotton et al., 2004). For instance large body size in both females and males is favoured by sexual selection because large traits generally correlate with fecundity or fertility (Curtis & Stoddard, 2003; Basolo, 2004). Yet, body size often varies with environmental factors such as temperature, food availability, social interactions, geographic distribution (Yom-Tov & Geffen, 2006), thus adaptive mate choice tracking changes in body size would uncover the environmental factors responsible for the size change, such as pollution with pesticides.

The consequences of pollution in water bodies are diverse, but can be grouped into two categories: 1) changes in abiotic parameters related to water quality such as transparency, dissolved oxygen and nutrients, and 2) presence of toxic substances. For example, eutrophication produces an increase in turbidity in which visual components of mate choice are affected. Seehausen et al. (1997) demonstrated that eutrophication has provoked biodiversity loss amongst native cichlid species in Lake Victoria because a reduced transparency has affected sexual selection based on coloration, which is responsible for maintaining reproductive isolation among sympatric species. Eutrophication also reduces the concentration of oxygen, and Reynolds & Jones (1999) observed that low oxygen condition produces a reversal of female mating preference in common gobies (*Pomatoschistus microps*). At normal concentrations of dissolved oxygen, goby females prefer males that already have eggs under their parental care over those without eggs, but female choice is reversed at 35% dissolved oxygen, presumably because large egg masses demand more oxygen than small clutches. Chemical compounds can also interfere directly with female choice in relation to their mechanism of action. For example, endocrine disrupting chemicals such as 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, 4-tert-octylphenol (4OP), phthalates and alkylphenols interact with estrogenic receptors in the brain, causing reproductive behavioural changes, which would not be necessarily related to female choice. Bjerselius et al. (2001) observed a reduction in *following* behaviour in male goldfish (*Carassius auratus*) after exposure to 1 $\mu$ g E<sub>2</sub>/L and 10 $\mu$ g E<sub>2</sub>/L. An opposite effect was found by Toft & Baatrup (2003), who reported an increase in courtship behaviour in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 100 $\mu$ g 4OP/L. In the case of neurotoxic compounds such as OPs, several studies have reported effects on swimming behaviour (see above), however Arellano-Aguilar & Macías Garcia (2008) reported for the first time the non-neurotoxic effects of OP pesticides on intersexual selection in the Amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*). This report showed that sublethal exposure to methyl parathion during embryonic development affects the condition of adults and their attractiveness to choosy females; particularly male ornaments (size and colour) and courtship display (details of experiment below). Following Arellano-Aguilar & Macías Garcia

(2008) report, Cothran et al. (2010) could not find evidence that another OP, malathion, at sub-lethal concentration affects female mate choice in American amphipods (*Hyalella sp.*). However, there are good reasons to expect that any chemical compound that interfere with sexual signal expression would negatively influence mate choice. Accordingly, Secondi et al. (2009) found that realistic nitrate concentrations affect the sexual trait size in newts (*Triturus helveticus*), reducing the sexual attractiveness of males. Female newts showed a clear preference for unexposed males (Secondi et al, 2009), a behavioural response similar to that observed in the experiment with Amarillo fish. Clearly more research is needed to understand the ecological and evolutionary implications of the interaction between low concentrations of pollutants and sexual selection.

### 1.3 Demographic consequences

The demographic consequences for a population may not be apparent at the time of exposure, but become evident in the long run, even after several generations have passed. Pollutants may perturb the population dynamics or even irreversibly impair its survival. Walker et al. (2006) mentioned that in chronic pollution, populations of some species might decline and eventually become extinct, or they may recover, persist or even increase. To improve our capability to predict the possible outcome of pollution it is necessary to know the dynamic of the focal populations, through gathering accurate estimates of some demographic parameters such as sex ratio, age structure, age-specific fecundity and mortality, and rate of increase or growth rate. These parameters can be used to make reasonable predictions of the populations' growth or decline, and to determine the impact of particular life stages on the demographic behaviour of the population. They are obtained by directly counting (or sampling) the individuals and tallying their survival, mortality and fecundity. From those data indirect measures such as the sex ratio, the proportions of new born, young and adults and the population age structure are then calculated and used to estimate growth rates (Skalski et al., 2005).

One of the simplest ways to verify if a population is increasing or decreasing is subtracting the number of the individuals at a posterior time ( $N_{t+1}$ ) against the current population size ( $N_t$ ). The difference is the number of individuals added or lost in the next generation. It is to be expected that the number of individuals some time in the future ( $N_{t+1}$ ) is affected by the population size ( $N$ ), the number of births and of deaths in the current generation. It would be also necessary to determine whether there are immigrants to add and/or emigrants to subtract from the current population size, but it is often assumed for simplicity that populations are closed and that no immigration or emigration takes place. In continuous population growth, where births ( $B$ ) and deaths ( $D$ ) are constantly occurring, the rate of change in population size during a given period ( $dt$ ) is:

$$dN_t/dt=B-D \quad (1)$$

The instantaneous birth rate ( $b$ ), or the number of births per individual per unit time is calculated by the total number of births divided by the total numbers of individuals,  $b=N/B$ . Similarly, the instantaneous death rate ( $d$ ) is the division of the total number of deaths between the individuals,  $d= N/D$ . From these equations;

$$dN_t/dt=(b-d)N \quad (2)$$

Thus  $(b-d)$  represents the intrinsic or instantaneous rate of increase ( $r$ ), which is the *per capita* rate of change, or growth rate, of the population per unit time. The value of  $r$  is important as it reflects the vitality and the potential of the population to increase. If the intrinsic rate of increase  $r>0$ , the population increases, if  $r=0$ , the population size remains stationary and  $r<0$  indicates that the population is decreasing.

$$dN_t/dt= rN \quad (3)$$

A modification of the above is necessary when birth and death rates are not continuous. In many species births are discrete events that occur one or more times a year, at specific times or seasons (e.g. in the spring). In those species deaths may also occur at discrete periods in the year. In these cases  $r$  should be replaced by the finite rate of change ( $\lambda$ ) which represents the proportional change in abundance from time  $t$  ( $N_t$ ) to time  $t+1$  ( $N_{t+1}$ ). The finite rate of increase ( $\lambda$ ) is the growth rate per period of time (usually a year) and it is calculated as follows:

$$\lambda = N_{t+1}/N_t \quad (4)$$

Just as before,  $\lambda > 1$  indicates that the population is increasing;  $\lambda = 1$  indicates a stationary population and  $\lambda < 1$  indicates a decreasing population. For example,  $\lambda = 1.17$  represents a 17% of increase in the population between  $t$  and  $t+1$ . There are several methods to calculate  $r$  and  $\lambda$ , including the Lotka equation based on fecundity rate, and population projection Leslie matrices based on survival rates (Leslie 1945; Skalski et al., 2005). These parameters ( $r$  and  $\lambda$ ) are used commonly to describe the population growth and to compare growth rates among populations of the same or different species.

$$\lambda = e^r, \text{ or equivalently, } r = \ln \lambda \quad (5)$$

To characterise demographic parameters such as absolute growth rates ( $r$  and  $\lambda$ ) is not enough to ensure the conservation of a population. This also requires knowledge of the genetic status of the population, including how much genetic diversity it harbours, what is the degree of inbreeding amongst its members, whether it is subject to genetic drift, its mutation load and its effective population size (related to the mating system). The effective population size ( $N_e$ ) is a crucial attribute: it is a genetic measure of the number of individuals needed to maintain the same genetic diversity between generations. As it is directly related to the rate at which genetic diversity is lost,  $N_e$  also measures the rate at which genetic drift affects the population (Rieman & Allendorf, 2001). In general, quantifying the amount of genetic diversity within a population or species is of the utmost importance in conservation genetics (Crandall et al., 1999), and no other genetic parameter affects the population demography as much as  $N_e$ , which is why the concept of effective population size has played an important role in the conservation genetics of endangered species.

Populations often have unequal numbers of males and females mating and contributing to the next generation. But, regardless of the total number of individuals, both sexes contribute an equal number of genes (Allendorf & Luikart, 2007). The effective size of a population with unequal numbers of males and females mating randomly is calculated as:

$$N_e = 4N_m N_f / (N_m + N_f) \quad (6)$$

Where  $N_m$  and  $N_f$  are the quantity of breeding males and females, respectively. Therefore, the effective population size ( $N_e$ ) is slightly smaller than the absolute population size ( $N$ ; Kimura & Crow, 1963). On the other hand, if there is sexual selection acting on the population, where mating is biased in favour of only a fraction of the members of one sex, one of the consequences is an even greater reduction of the number of reproductive adults that contribute to the next generation.

Although sexual selection reduces the probability that deleterious mutations get fixed (because fit individuals are chosen by females attracted by their ornaments), it also affects the population genetic structure by reducing the level of heterozygosity (Kimura & Crow, 1963; Futuyma, 1998). Strong directional selection means that some alleles become fixed and in a short time the population becomes monomorphic as it loses the additive genetic variance underlying the expression of traits (including those used in mate choice; Merilä & Sheldon, 1999). In those circumstances genetic diversity would be strongly influenced by inbreeding, genetic drift and genetic bottlenecks (Price, 2005), and populations would be therefore more vulnerable to mutation loads and demographic stochastic fluctuations (Kimura et al., 1963). For instance, Bailey et al. (2007) explored the genetic variability of wild and captive populations of two fish species with intense sexual selection. They found that low effective population size contributes to increasing the risk of local extinction. The effect is more severe when anthropogenic factors such as pollution, introduction of exotic species or overfishing are also present because both the population size and  $N_e$  are affected. In the next section we describe a project designed to understand the mechanism that may reduce  $N_e$  in a species under intersexual selection when it is also exposed to pollutants. Ecotoxicological studies have focused on demographic changes, using population growth rate as the key measure of the possible long-term effects of pollution. We attempted to gather evidence to support our view that the concept of effective population size ( $N_e$ ) plays an even more important role in the management and conservation of threatened species.

## 2. A case of study

### 2.1 The organophosphate methyl parathion and the fish *Girardinichthys multiradiatus*

We shall illustrate how the exposure to an organophosphate -methyl parathion (MeP)- can exacerbate the demographic consequences of intersexual selection in the Mexican fish *Girardinichthys multiradiatus*. First we will briefly describe the peculiar attributes of the focal species and the pollutant involved. Then we will describe the different levels at which MeP adversely affects this fish. We will demonstrate how pesticides can affect the individual's phenotype, specifically the male ornaments, and how this consequently affects their attractiveness. We will then look into the effects at the population level; we will show the immediate demographic consequences and those that take place over successive generations of MeP exposure. Our data are mostly the result of experiments in which fish were exposed to different concentrations of MeP administered at different life stages. The study was carried out in a paradigm of artificial selection in a captive environment.

Our model is the topminnow *Girardinichthys multiradiatus*. This is a small fish that belongs to the Mexican Goodeidae, a group of viviparous fish in which sexual dimorphism is the norm. Males have large and more colourful fins than females and exhibit a complex courtship display (Macías García, 1994). Females mating preferences are based on visual attributes like sexually dimorphic median fins, dimorphic colours and colour patterns (especially the yellow colour of the fins) and conspicuous courtship dances (Macías García and Saborío, 2004). Fish in this species can detect UV light, and body reflectance in this wavelength is used also in female mate choice (Macías García and Burt de Perera, 2002). *Girardinichthys multiradiatus* inhabits shallow areas in lakes, wetlands, streams and dams in the upper Lerma basin on the Mexican Central Plateau (Macías García, 1994; Uribe, 2005). Its geographic distribution is restricted to about 11 sites (including streams and rivers) in the region of the Country where economic and industrial development is growing at a faster rate, besides being occupied in ca. 55% by agricultural activities (SNIARN 2006). Both their restricted distribution and reproductive biology -including viviparity and stringent female mate preferences- predispose the Mexican Goodeidae (or Goodeinae) to suffer from environmental fragmentation and other anthropogenic influences. In fact the principal factors of population decline in this family are desiccation and habitat destruction. Additionally, eutrophication, introduction of exotic species and pollution are also responsible for the ongoing increase in the rate of local extinction (De la Vega-Salazar & Macías García, 2005). The Goodeinae encompass some 16 genera with ca. 42 species, of which 22 are in some category of risk (8 endangered, 9 threatened, 3 in extreme danger of extinction and 2 extinct in nature; Contreras-Banderas, 2005; De la Vega-Salazar et al., 2005). The International Union for the Conservation of Nature IUCN Red list (1998) considers *G. multiradiatus* as vulnerable.

Through their natural range Goodeine fish are exposed to several pesticides, including the insecticide methyl parathion (MeP). This is an organophosphate largely used on a number of economically important agricultural crops such as cotton, soybean, corn, wheat, rice and bean (García et al., 2003). The MeP used as pesticide reaches the ground and through percolation gets into the water bodies. MeP has a combination of chemical and physical properties that make it soluble in most organic solvents and also in some inorganic compounds, which is why this pollutant can easily enter into the aquatic systems. *Girardinichthys multiradiatus* is exposed to MeP in the field, where pregnant females show a negligible concentration in their tissues, about one order of magnitude below that in the tissues of the embryos they carry (De la Vega-Salazar et al., 1997).

### 2.2 What are the effects of early sub-lethal exposure of MeP in *Girardinichthys multiradiatus*

Two experiments were carried out to assess whether *G. multiradiatus* is negatively affected when exposed to sub-lethal concentrations of MeP; both involved contaminating a group of individuals with MeP and comparing the effects with a control group. The experimental design was planned *a priori* to reduce as much as possible the sources of variation and to increase the power of the analysis. Fish were maintained in aquaria at 25±2°C and under a 12h dark/12h light photoperiod. In the first experiment (part two) we used a paternal half-sib protocol because we presumed that

secondary sexual traits are heritable in this species. In the first experiment we used the second generation of fish collected in the wild (at San Juanico; 19°55' N, 99° 47' W), which had been kept in outdoor ponds at the Institute of Ecology-UNAM, Mexico (details in Arellano-Aguilar & Macías García, 2009). First we calculated the LC<sub>50</sub> and the bioaccumulation curve by feeding the fish 0.1 g of spiked food per day. Individuals at the start of the experiment were of the same age, weight and length. We used a gradient of MeP concentrations (0.001-0.165 µg MeP/g dry weight of food) for 30 days, and compared the effects with control fish kept under the same conditions and fed un-spiked food. Fish were measured (mm) and weighed (g) at the beginning and at the end of the experiment, and growth was calculated as the percentage of initial body length  $[(\text{final length} - \text{initial length}) / \text{initial length}] \times 100$ . As reported originally (Arellano-Aguilar & Macías García, 2009) the accumulation of MeP in adult *G. multiradiatus* follows a dose-dependent relationship. Fish exposed to concentrations of 0.008, 0.02 and 0.04 µg of MeP for 30 days showed a reduction in size and weight. In addition, MeP was lethal at 0.165 µg/g. Bioaccumulation of MeP was measured in fish from each concentration using gas chromatography. This allowed us to determine the amount of MeP that should be added to the food given to pregnant females in order to mimic the concentrations reported in wild fish (De la Vega-Salazar et al., 1997). This procedure did in turn enable us to evaluate the consequences of pre-natal exposure to realistic concentrations on adult reproductive performance. As expected from sub-lethal concentrations, pregnant females exposed to 0.005, 0.01 and 0.1 µg/g did not show any negative effect, but they delivered varying proportions of malformed offspring. The main teratogenic effect was spinal cord malformation (scoliosis), which could be a consequence of inhibition of AChE during embryonic development. Around 60% of the total offspring exposed via mother to 0.005 µg/g MeP was apparently normal and survived to adulthood.

### **2.3 Are there consequences of early MeP in adult fish?**

We examined the morphology and behaviour of adult fish which had been prenatally exposed to realistic concentrations of MeP. Adult males were presented with one matched-pair of non-pregnant females each. After 10 days, females were isolated in independent tanks, where they remained until parturition. One female from each pair was fed food containing a concentration of 0.005µg MeP/g (dry weight) and the other female was feed uncontaminated food. Shortly after birth each newborn brood was transferred to a MeP-free 40 l aquarium until sexes could be distinguished, when each individual was isolated in cylindrical compartments and placed in single-sex aquaria. Survival of newborn offspring prenatally exposed to 0.005µg MeP/g was comparable to that of control fish up to adulthood (90 days of age), yet morphology and behavioural performance were compromised. Dimorphic fins were less developed, colour duller, and reproductive behaviour (frequency and duration of courtship displays ) less energetic in exposed than in control fish. The results (reported in Arellano-Aguilar & Macías García, 2008) showed also that exposed fish were smaller than controls, and that the development of their ornamental fins did not resemble that of their fathers, whereas it was significantly heritable in their control half sibs ( $h^2=2m= 1.13\pm 0.096$ ).

### **2.4 Early exposure to sub-lethal dosages of MeP impairs male ornamentation; does it affect male attractiveness?**

Having established that embryonic exposure to low concentrations of MeP negatively affects male ornamentation and courtship behaviour, we evaluated whether this would have reproductive consequences. Test were conducted in aquaria divided into three compartments, the central one being occupied by a female and the lateral compartments being used to place one control and one exposed male in each. Both experimental and control females were tested in their preferences. We recorded frequency and duration of female visit and frequency of copulation attempts for 20 min, and found that both types of females had significant preferences for control males, thus we conclude that exposed males were less attractive to female than their control half-siblings (Arellano-Aguilar & Macías García, 2008).

### **2.5 Sub-lethal exposure to MeP affects the individual; are there population consequences over the long term?**

The following experiment was designed to find out whether the exposure to 0.005µg of MeP had consequences at the population level and through generations. We used this concentration because it appears, from our experiments summarised above, that it has no direct effects on the individuals, but when pregnant females are exposed to this

concentration, their offspring grow to be less attractive and court less vigorously than control fish. We collected pregnant females from a location in the upper Lerma basin (Salazar, 19° 18.33' N, 99° 23.35' W), and all the experiments were conducted on their progeny in the laboratory. Each generation was kept in aquaria only until the females gave birth, when all adults were removed and their descendants left to constitute the next generation. In this way we equalled one generation with one cohort. For example, the offspring born from females collected in the field (parental generation, or P), were separated from their mothers and were considered generation F1. We did not use the females from the field as the parental generation in order to avoid the potential effects of unrecorded variables. Members of F1 were distributed into a control and an experimental (exposed) group. Once they reached adulthood (at 90 days of age) experimental fish were exposed to food laced with 0.005 $\mu$ g of MeP/g of dry weight.

First we verified the results of the original experiments. As in the previous report (and in Arellano-Aguilar & Macías García, 2008) we also measured morphological characters and the attractiveness of the males, with the difference that here we did not use a half-sibling protocol, as we were interested in assessing the effects at the population level. Since the half-sibling protocol reduces the genetic variance between individuals, it is reasonable to expect differences between the two experiments. To confirm whether males exposed prenatally to sub-lethal concentrations of MeP grow to be morphologically unattractive adults, we followed the protocol used by González Zuñiga & Macías García (2006), and measured in males and females six attributes historically associated with female mate choice (1 to 6 in Fig. 3), and four not associated with it (A to D).

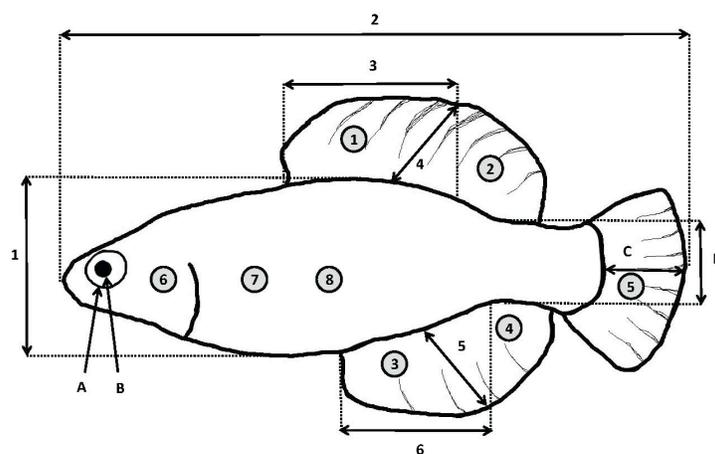


Fig. 3. Morphological measures of *Girardinichthys multiradiatus* and, within circles, the places where colour (reflectance) was measured by spectrophotometry. Numbers denote the measures that have been systematically found to influence female preferences, and letters indicate measures not known to influence female mate choice.

The measures were then entered into a principal components analysis (PCA). This protocol was repeated for three generations. The first component of the PCA (PC1; 74.18% variance explained) gave large loadings to measures related to fish size, whereas the second component (PC2; 20.84% variance explained) reflected sexual dimorphism. Together these components explained most of the morphological variance in our experiments (95.02%; Fig. 3). An ANOVA revealed that fish varied significantly in their PC1 scores ( $F_{1,219}=53.82$ ,  $p=0.000$ ). The difference between sexes in the PC1 was also significant ( $F_{1,219}=48.23$ ,  $p=0.000$ ), with females being normally larger as in most viviparous fish. A decrease in size (PC1) among the three generations was significant in females ( $F_{1,143}=57.05$ ,  $p=0.000$ ) and males ( $F_{1,75}=9.05$ ,  $p<0.001$ ), and there was also a significant interaction between generation and sex (generation X sex;  $F_{1,219}=5.33$ ,  $p=0.005$ ; Fig. 4) implying that females (whose size is tightly related to fecundity) become smaller in captivity. There was also a significant effect of generation in the PC2 of females ( $F_{1,143}=8.30$ ,  $p<0.001$ ), whose morphology became increasingly different from that of males. More direct comparisons of size showed that the relative depth (the ratio of measures 1/2) decreased across generations in both females ( $F_{1,143}=26.80$ ,  $p=0.000$ ) and males ( $F_{1,75}=6.77$ ,  $p<0.005$ ), but the relative fin size decreased significantly only in males ( $F_{1,75}=20.03$ ,  $p=0.000$ ), where it is beyond the ecological optimum by the action of female mate choice (Macías García et al., 1994). Unexpectedly, tail

size decreased across generations in both females ( $F_{1,143}=35.14, p=0.000$ ) and males ( $F_{1,75}=17.62, p<0.001$ ). There was no significant difference in the eyes' measurements. All the differences over the three generations were due to a significant reduction in size. In addition, experimental females in the second generation were significantly smaller than control females ( $F_{1,31}=4.70, p=0.038$ ; Fig. 4).

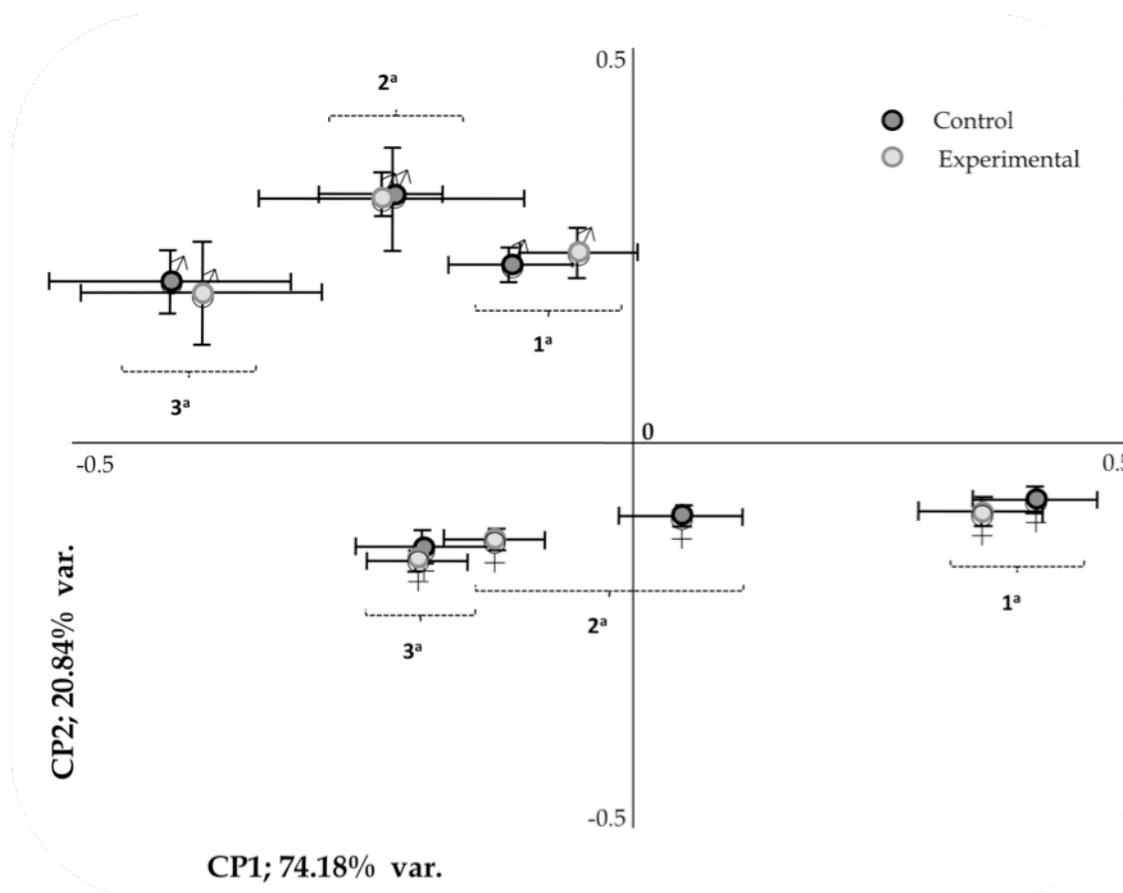


Fig. 4. Principal Component Analysis (PCA) of body measures. The first principal component captured most of the variance in size, and the second reflects sexual dimorphism. There was a decrease in size across generations in both sexes, and it was significantly large for females (the larger sex, where fecundity is related to size) in the second generation.

Fish colour was measured with a spectrophotometer and assessed with appropriate software (Spectra Suite). We analysed the UV (360-400  $\mu\text{m}$ ), yellow (500-630  $\mu\text{m}$ ) and total chroma (360-740  $\mu\text{m}$ ) reflectance measured at eight different regions of the body and fins (see Fig. 3). The areas measured and the regions of the spectrum selected were chosen following previous studies showing their relevance for sexual selection. The UV reflectance decreased significantly on the third generation ( $F_{1, 227}= 189.75, p= 0.000$ ), in both sexes ( $F_{1, 227}= 24.72, p= 0.000$ ), and was also lower in the experimental group ( $F_{1, 227}= 4.01, p= 0.046$ ) than in control fish. The carotenoid (yellow) colour of the dimorphic fins showed an unexpected significant increase among generations; fin yellow reflectance was higher in the third generation in both males and females ( $F_{1, 227}= 208.57, p= 0.000$ ). Still, prenatal exposure to MeP also affected dimorphic yellow chroma, with the fins of experimental males showing a reduced reflectance in the yellow region than those of control males ( $F_{1, 227}= 5.03, p= 0.026$ ). Finally, total chroma decreased among generations ( $F_{1,227}= 16.91, p= 0.000$ ) but was significant higher in control ( $F_{1,227}= 6.52, p= 0.001$ ) than in experimental males.

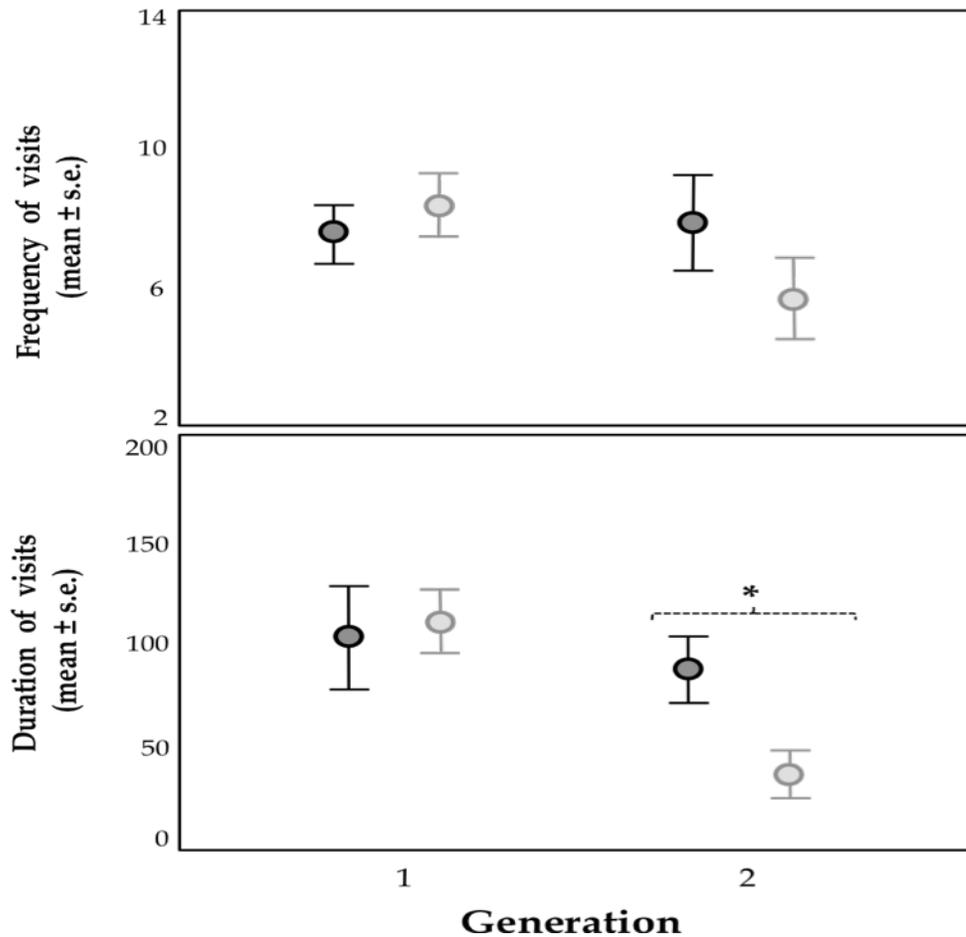


Fig. 5. Females in the first and second generation made as many visits to experimental and to control males, but their visits to the former were shorter in the second generation.

Attractiveness was as assessed by measuring female preference in dichotomous tests as before. We found (Fig. 5) that in the first generation there were no differences in the frequency ( $t_{1,71}=-1.01$ ,  $p>0.05$ ) or the duration ( $t_{1,71}=-0.30$ ,  $p>0.05$ ) of the visits by the females (control or experimental) to the males; females visited for as long, and as frequently, the experimental and the control males. The results in the second generation were different. Females again made the same number of visits to both types of male ( $t_{1,34}=3.90$ ,  $p>0.05$ ), but their visits to the control males were on average longer ( $t_{1,196.12}=2.01$ ,  $p=0.047$ ), and thus spent significantly more time next to control than to experimental males ( $t_{1,34}=3.82$ ,  $p=0.002$ ). This seems to reflect a cumulative effect of the pesticide. The females did not discriminate between males in the first generation, but could distinguish in the second generation and preferred to remain associated with control males. It is interesting to remember that there were no differences in morphology between treatments in this generation, thus we propose that the female preference for control males in the second generation was due to differences in behaviour, in particular to courtship displays.

We followed two strategies to analyse the demographic data from this experiment. First we analysed the original data, and then we estimated population dynamics projections using a random re-sampling procedure. We did find a decrease in the population size over the generations, seemingly due selection to adapt to captive conditions. This pattern was confirmed by our re-sampling analysis, which seems to suggest, nevertheless, that the experimental

populations decrease more rapidly than the control ones (Fig. 6). However, there were some demographic patterns that differ between treatments. The number of offspring born was similar in control and in experimental tanks in every generation ( $F=0.74$ ,  $p=0.39$ ), but experimental offspring had a higher early mortality rate (< 1 month old) than control fish ( $F=6.63$ ,  $p=0.011$ ). We also found that the frequency of fish with malformations (such as scoliosis, lordosis, etc.) in the experimental group was significantly higher than in the control group (Fig. 7;  $F=5.52$ ,  $p=0.020$ ).

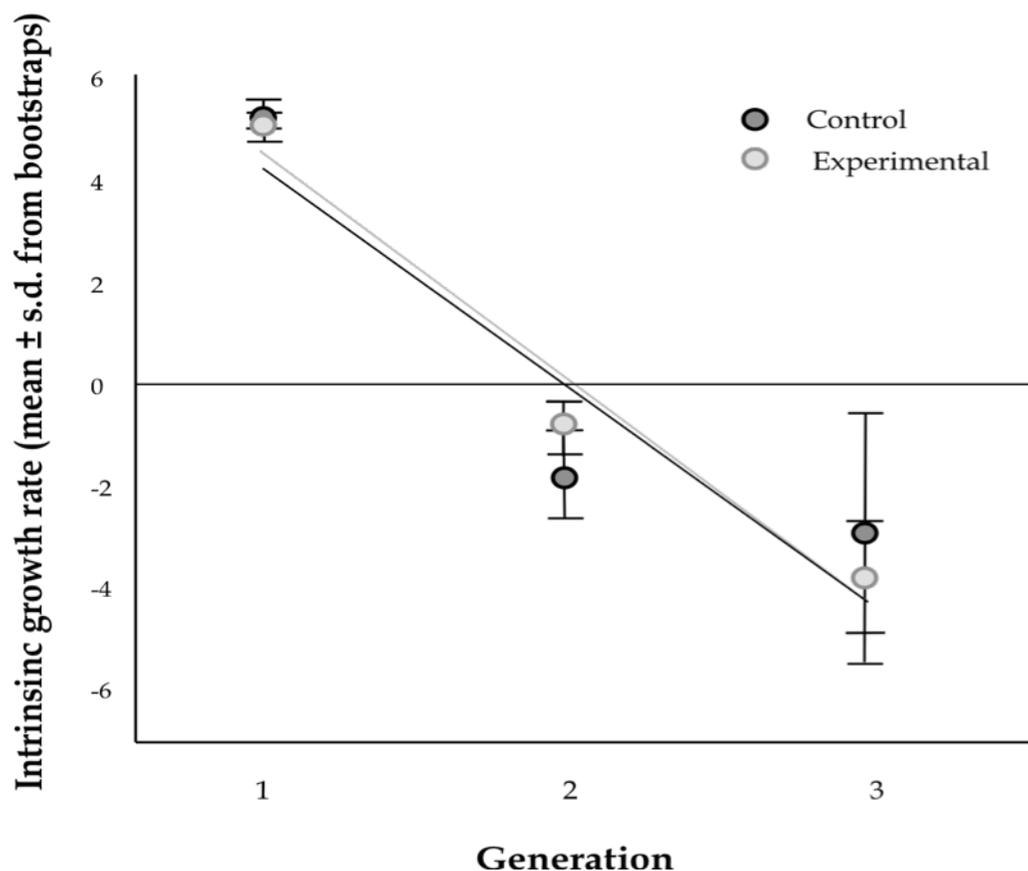


Fig. 6. The intrinsic growth rate of captive populations of *Girardinichthys multiradiatus* (confidence intervals from 1000 bootstrapped simulations) decrease from between generations due to selection to the aquarium conditions, but also in response to intra-ovary exposure to MeP. A similar pattern was observed in fecundity, which decrease between generations, was lower for exposed fish (and decreased faster for experimental fish).

### 3. Conclusions

It is uncertain whether alternative technologies will ever be developed to help producing large crops without the need of pesticides. Genetic manipulation may hold a key, yet for the moment we are forced to use pesticides and to try to minimise their collateral, unintended effects. One traditional approach to assessing the risks inherent to pesticide use has involved measuring the consequences of exposure to lethal concentrations –at least to  $LC_{50}$  – and has largely neglected the effects of lower concentrations. Indeed, it is impractical to evaluate natural populations exposed to sub-lethal concentrations of pesticides, not least because effects of such exposure may be subtle, and subtle effects require large sample sizes to be detected. We propose that bioassays relying on ecologically relevant complex behaviours may facilitate the task. Unlike the relatively simple, reactive behaviours normally included in toxicological tests, the complex sequences of behaviour involved in courtship or foraging activities constitute the integrative outcome of many physiological and developmental processes, and are thus more likely to provide evidence of toxicological damage. Their study, however, requires consideration of Behavioural-Ecological theory, and the use of tools from

Population Ecology and Genetics. Our initial results studying the effect of methyl-parathion on a sexually dimorphic fish are encouraging. We have shown that prenatal exposure to a sub-lethal concentration of the insecticide increases the probability that offspring are born with defects. Surviving offspring grow to become unattractive adults, the males are shunned by their females and the females' fecundity is diminished. The effects accumulate through generations and together can compromise the survival of populations. This is likely to be a general effect in species where sexual selection is intense, and demonstrates the need to incorporate Behavioural Ecology and the study of sub-lethal effects in the growing field of Ecotoxicology.

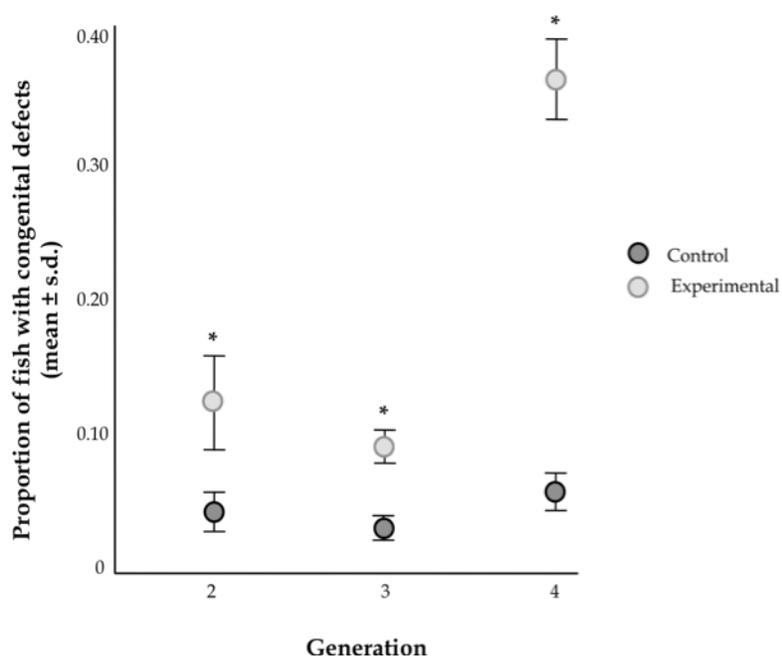


Fig. 7. The proportion of offspring born with deformities (mostly scoliosis) was significant larger (\*) in fish exposed to MeP before birth than in controls. In the latter the incidence of those malformations remained below 10% in all generations, whereas in experimental fish it increased to more than one third in the last generation.

#### 4. Acknowledgements

Founding for this project was provided by the University's research program PAPIIT (grant IN221506) to CMG. IB and OAA were recipients of scholarships the Mexican Science Council (CONACyT). We thank E. Ávila Luna for logistical support, and M. E. Gonzalez, M. Cervantes and N. Villasana from the Animal Health Verification Center (CENAPA) for help with biochemical essays.

#### 5. References

- Abu-Qare, A.; Abdel-Rahman, A.; Kishk, A. & Abou-Donia, B (2000). Placental transfer and pharmacokinetics of a single dermal dose of [14C] methyl parathion in rats, *Toxicological Sciences*, 53, 1, 5-12, ISSN 1096-6080
- Allendorf, F. & Luikart, G. (2007). *Conservation and the genetics of populations*, Blackwell Publishing, ISBN 4051-2145-9, UK
- Andersson, M. (1994). *Sexual Selection*. Princeton University Press, ISBN 0691 03344 7, Princeton, New Jersey, USA
- Andersson, M. & Simmons, L. (2006). Sexual selection and mate choice, *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 6, 296-302, ISSN 0169-5347

- Arellano-Aguilar, O. & Macías García C. (2008). Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males, *Proceedings of the Royal Society*, 275, 1640, 1343-1351, ISSN 0962-8452
- Arellano-Aguilar, O. & Macías García C. (2009). Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*, *Environmental Toxicology*, 24, 2, 178-186, ISSN 1520-4081
- Baerends, G. (1976). The functional organization of behaviour, *Animal Behaviour*, 24, 726-738, , ISSN 0003-3472
- Bailey, N.; Macías García, C. & Ritchie, M. (2007) Beyond the point of no return? A comparison of genetic diversity in captive and wild populations of two nearly extinct species of Goodeid fish reveals that one is inbred in the wild, *Heredity*, 98, 6, 360-367, ISSN 0018-067X
- Barron, M. (2002). Environmental contaminants altering behaviour, In: *Behavioural ecotoxicology*, Giacomo Dell'Omo (Ed.), 167-186, John Wiley & Sons Ltd., ISBN 0471-96852-8, Chichester, West Sussex, UK
- Basolo, A. (2004). Variation between and within the sexes in body size preferences, *Animal Behaviour*, 68, 1, 75-82, ISSN 0003-3472
- Bjerselius, R.; Lundstedt-Enkel, K.; Olsén, H.; Mayer, I. & Dimberg, K. (2001) Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ -estradiol, *Aquatic Toxicology*, 53, 2, 139-152, ISSN 0166-445X
- Bondarenko, S. & Gan, J. (2004). Degradation and sorption of selected organophosphate and carbamate insecticides in urban stream sediments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 8, 1809-1814, ISSN 0730-7268
- Bonfanti, P.; Colombo, A.; Orsi, F.; Nizzetto, I.; Andrioletti, M.; Bacchetta, R.; Mantecca, P.; Fascio, U.; Vailati, G. & Vismara, C. (2004). Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development, *Aquatic Toxicology*, 70, 3, 189-200, ISSN 0166-445X
- Boone, S. & Chambers, J. (1996). Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in Mosquitofish (*Gambusia affinis*), *Fundamental and Applied Toxicology*, 29, 2, 202-207, ISSN 1096-6080
- Börjeson, H., & Norrgren, L. (1997). M74 syndrome: a review of potential etiological factors, In: *Chemically induced alterations in functional development and reproduction of fishes*, Rosalind M. Rolland, R. M.; Gilberston, M.; & E. Peterson, R. E. (Eds.), (153-166), SETAC Technical Publications Series, ISBN 1-880611-19-8, Pensacola, FL., USA.
- Castillo, C.; Montante, M.; Dufour, L.; Martinez, M.; Jimenez-Capdeville, M. (2002). Behavioural effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats, *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 6, 797-804, ISSN 0892-0362
- Contreras-Balderas, S. (2005). Conservation Status of Mexican Freshwater Viviparous Fishes, In: *Viviparous Fishes*, Uribe, M. & Grier, H. (Eds.), 415-423, New Life Publications, ISBN 0-9645058-5-1, Mexico
- Cothran, R.; Greco, R. & Relyea, R. (2010). No evidence that a common pesticide impairs female mate choice in a freshwater amphipod, *Environmental Toxicology*, 35, 3, 310314, ISSN 1520-4081
- Cotton, S.; Fowler, K. & Pomiankowski, A. (2004). Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis?, *Proceedings of the Royal Society*, 271, 1541, 771-783, ISSN 0962-8452
- Crandall, K.; Posada, D. & Vasco, D. (1999). Effective population sizes; missing measures and missing concepts, *Animal Conservation*, 2, 4, 317-319, ISSN 1367-9430
- Curtis, C. & Stoddard, P. (2003). Mate preference in female electric fish, *Brachyhyopomus pinnicaudatus*, *Animal Behaviour*, 66, 2, 329-336, ISSN 0003-3472
- Darwin, C. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex*, John Murray, Albemarle Street, London UK
- Das, P. & John, G. (1999). Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Eetroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticide, *Toxicology Letters*, 104, 1-2, 111-116, ISSN 0378-4274
- De la Vega Salazar, M.; Martínez-Tabche, L. & Macías García, C. (1997). Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community at Ignacio Ramirez dam in México, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 53-62, ISSN 0147-6513
- De la Vega-Salazar, M. & Macías García, C. (2005). Principal Factors in the Decline of the Mexican Endemic Livebearing Fishes (Goodeinae: Goodeidae), In: *Viviparous Fishes*, Uribe, M. & Grier, H. (Eds.), 505-513, New Life Publications, ISBN 0-9645058-5-1, Mexico
- Fanta, E.; Rios, S'A. F.; Romão, S.; Vianna, C.C.A. & Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 2, 119-130, ISSN 01476513
- Fisher, H.; Wong, B. & Rosenthal, G. (2006). Alteration of the Chemicals environment disrupts communications in a freshwater fish. *Proceedings of the Royal Society B*, 273, 1951, 1187-1193, ISSN 0962-8452
- Fisher, R. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press, ISBN 0 19 850440 3, Great Clarendon Street, Oxford NY, USA

- Futuyma, J.D. (1998). The evolution of behavior, In: *Evolutionary Biology*, Douglas J. Futuyma (Ed.), 586-601, Sinauer Associates, Inc., ISBN 0-87893-189-9, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Garcia, S.; Abu-Qare, A.; Meeker-O'Connell, W.; Borton, A.; Abou-Donia, M. (2003). Methyl parathion: a review of health effects, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6, 2, 185-210, ISSN 1660-4601
- González Zuarth, C. & Macías García, C. (2006). Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. *Proceedings of the Royal Society*, 273,1584, 301-307, ISSN 0962-8452
- IUCN. 2010. Red list of threatened species. <http://www.iucn.org>
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology*, 166, 3, 139-160, ISSN 0300-483X
- Jones, J. & Reynolds, J. (1997). Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7, 4, 463-491, ISSN 0960-3166
- Kimura, M. & Crow, J. (1963). The measurement of effective population number, *Evolution*, 17, 3, 279-288, ISSN 0014-3820
- Kimura, M.; Maruyama, T. Crow, F.J. (1963). The mutation load in small populations, *Genetics*, 48, 10, 1303-1312, ISSN 0016-6731
- Lehner, N.P. (1996). A conceptual model of animal behavior, In: *Handbook of ethological methods Second Edition*, Philip N. Lehner (Ed.), 19-23, Cambridge University Press, ISBN 0-521-55405-5, New York, NY., USA.
- Leslie, P. (1945). On the use of matrices in certain population mathematics, *Biometrika*, 183212, ISSN 0006-3444
- Li, Q. (2007). New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity, *Journal of Nippon Medical School*, 74, 2, 92-105, ISSN 1345-4676
- Little, E. (1990). Behavioral toxicology: stimulating challenges for a growing discipline, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 1, 1-2, ISSN 0730-7268
- Macías García, C. & Burt de Perera, T. (2002). Ultraviolet-based female preferences in a viviparous fish, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52, 1, 1-6, ISSN 0340-5443
- Macías García, C. & Saborío, E. (2004). Sperm competition in a viviparous fish, *Environmental Biology of Fishes*, 70, 211-217, ISSN 0378-1909
- Macías García, C. (1994). Social behaviour and operational sex ratios in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*, *Copeia*, 4, 919-925, ISSN 0045-8511
- Macías García, C.; Jimenez, C. & Contreras, B. (1994). Correlational evidence of a sexually-selected handicap, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35, 253-259, ISSN 0340-5443
- Markman, S.; Leitner, S.; Catchpole, C. & Müller, C. (2008). Pollutants increase song complexity and the volume of the brain area HVC in a songbird, *PLoS ONE*, 3, 2, ISSN 1932-6203
- Merilä, J. & Sheldon, B. (1999). Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas, *Heredity*, 83, 2, 103-109, ISSN 0018-067X
- Nimmo, R. & McEwen C. (1994). Pesticides, In: *Handbook of ecotoxicology*, Peter Calow (Ed.), 619-667, Blackwell Science Ltd., ISBN 0-632-03573-0, Main Street, Malden, USA
- Parker, M. & Goldstein, M. (2000). Differential toxicities of organophosphate and carbamate insecticides in the nestling European starling (*Sturnus vulgaris*), *Archives of Environmental and Contamination Toxicology*, 39, 2, 233-242, ISSN 0090-4341
- Price, D. (2005). The genetic considerations in the conservations of freshwater viviparous fish, In: *Viviparous Fishes*, Uribe, M. & Grier, H. (Eds.), 351-364, New Life Publications, ISBN 0-9645058-5-1, Mexico
- Reynolds, J. & Jones, J. (1999). Female preference for preferred male is reversed under low oxygen conditions in the common goby (*Pomatoschistus microps*), *Behavioural Ecology*, 10, 2, 149-154, ISSN 1045-2249
- Rieman, B. & Allendorf, F. (2001). Effective population size and genetic conservation criteria for bull trout, *North American Journal of Fisheries Management*, 21, 4, 756-764, ISSN 0275-5947
- Sarma, S.; Nandini, S.; Gama-Flores, J. & Fernández-Araiza, M. (2001). Population growth of *Euchlanis dilatata* (Rotifera): combined effects of methyl parathion and food (*Chlorella vulgaris*), *Journal of Environmental Science Health, B*, 36, 1, 43-54, ISSN 03601234
- Secondi, J.; Hinot, E.; Djalout, Z.; Sourice, S. & Jadas-Hécart, A. (2009). Realistic nitrate concentration alters the expression of sexual traits and olfactory male attractiveness in newts, *Functional Ecology*, 23, 4, 800-808, ISSN 0269-8463
- Seehausen, O.; van Alphen, J. & Witte, F. (1997). Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* 277, 5333, 1808-1811, ISSN 01934511
- Skalski, J.; Ryding, K. & Millsaugh, J. (2005). *Wildlife demography: analysis of sex, age, and count data*. Elsevier Academic Press, ISBN-13: 978-0-12-088773-6, USA
- SNIARN (2006). El medio ambiente en México 2005: en resumen. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, ISBN 968-817-777-6, México
- Toft, G. & Baatrup, E. (2003). Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 2, 228-237, ISSN

0147-6513

- Toft, G.; Edwards, T.; Baatrup, E. & Guillette, L. Jr. (2003). Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors, *Environmental Health Perspectives*, 111, 5, 695-701, ISSN 0091-6765
- Uribe, M. & Grier, H. (2005). *Viviparous Fishes*. New Life Publications, ISBN 0-9645058-5-1, Mexico
- Vittozzi, L.; Fabrizi, L.; Consigliolo, E. & Testai, E. (2001). Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and human, *Environment International*, 26, 3, 125-129, ISSN 0160-4120
- Walker, C. (1998). Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals, *Environmental Health Perspectives*, 106, 2, 613-620, ISSN 0091-6765.
- Walker, C.; Hopkin, S.; Sibly, R. & Peakall, D. (2006). Biomarkers, In: *Principles of ecotoxicology*, C. Walker, S. Hopkin, R. Sibly, D. Peakall (Eds.), 159-160, Taylor & Francis Group, ISBN 978-0-8493-3635-5, Boca Raton, FL., USA.
- Welsh, J.M. & Hanselka, W.C. (1972). Toxicity and sublethal effects of methyl parathion on behavior of Siamese fighting fish (*Betta splendens*), *The Texas Journal of Science*, 23, 4, 519-529, ISSN 0040-4403
- Yom-Tov, Y. & Geffen, E. (2006). Geographic variation in body size: the effects of ambient temperature and precipitation., *Oecologia*, 148, 2, 213-218, ISSN 0029-8549
- Zahavi, A. (1975). Mate selection- a selection for a handicap, *Journal of Theoretical Biology*, 53, 205-214, ISSN 0022-5193

## **9. CONCLUSIONES GENERALES**

En general, los resultados demuestran que individuos adultos del pez *G. multiradiatus*, expuestos al contaminante no son afectados a estas concentraciones subletales de MeP (F1), sin embargo, los críos expuestos sí se ven afectados, lo que genera repercusiones tanto a nivel individual como poblacional. Se observó que la exposición de MeP a concentraciones subletales durante el desarrollo embrionario ocasiona una mayor frecuencia de perturbaciones en la adultez de los organismos ya que solamente se encontraron efectos debido al tratamiento a partir de la segunda generación (F2, F3, F4 y F5).

En la morfología, la talla corporal decreció en sus diferentes variables y medidas, pero no por efecto del contaminante, sino por efecto del cautiverio. El único caso en que el contaminante disminuyó significativamente la talla corporal fue en las hembras en la segunda generación. En la coloración, los machos fueron afectados. Sus reflectancias de UV, de amarillo y de la saturación total del croma fueron las que presentaron mayores diferencias, también a partir de la segunda generación. Se supone que las alteraciones de color encontradas en el capítulo 1, principalmente alteraciones del croma amarillo en las aletas de los machos, fueron consideradas por las hembras. Las consecuencias de los cambios en los patrones de coloración de los machos, debido a la exposición al MeP, fueron suficientes para que las hembras los considerasen como menos atractivos.

Se observó que el ornamento sexual de los peces fue afectado durante su desarrollo pré-natal en especial en la segunda generación, donde las hembras prefirieron a machos del grupo control sobre los del grupo expuesto. Es posible que las alteraciones en los machos no fueron exclusivas en la coloración. Los efectos neurotóxicos del contaminante afectan el sistema motor de los peces, ocasionando alteraciones en sus movimientos. Por ello, se supone que el MeP también puede afectar el cortejo de los machos, en especial, los complejos despliegues de cortejo.

Finalmente, al hacer proyecciones poblacionales con los datos reales de las generaciones se observó que el grupo contaminado presenta una tasa de crecimiento significativamente menor que el grupo control en la segunda y tercera generación. Esto indica que las alteraciones morfológicas tienen un impacto directo en la adecuación de los peces. Además, la mortalidad y la frecuencia de malformaciones congénitas aumentaron gradualmente en F2 y F3 en el grupo experimental. Todas estas alteraciones, a largo plazo, pueden ser un factor de perturbación demográfica y consecuentemente disminuir el tamaño de las poblaciones naturales.

Las características ecológicas y reproductivas del pez *Girardinichthys multiradiatus* son agravantes para la conservación de esta especie. La viviparidad y el largo tiempo gestacional de las hembras las hace más susceptibles a una mayor depredación. Del mismo modo, la selección sexual intensa en la especie fomenta la morfología conspicua de los machos así como los exuberantes despliegues de cortejo y los hace más vulnerables a la depredación. Adicionalmente, poblaciones con selección intersexual normalmente presentan un sesgo dirigido hacia algún sexo generando una mayor reducción del número efectivo de individuos reproductivos. El endemismo, su distribución geográfica restringida y el tamaño reducido de sus poblaciones son factores que aceleran el proceso de extinción. Así mismo, la degradación de su hábitat natural, por contaminación, superexplotación, cambios físicos y químicos en el medio acuático y la introducción de especies exóticas son otros problemas enfrentados por los peces en la región central de México. No obstante, los peces y otros taxa acuáticos se encuentran hasta ocho veces en mayor peligro de extinción que otros grupos como aves y mamíferos (Master en Caro, 1998). Todo lo anterior resalta la importancia de estudios como éste, considerando las situaciones peculiares de especies endémicas bajo la problemática de la exposición a contaminantes en los ambientes acuáticos.

Evaluar los efectos de los contaminantes en los organismos y en ecosistemas debería ser el principal objetivo de los estudios ecotoxicológicos. Una alternativa para evitar o controlar los efectos tóxicos de los contaminantes puede ser el uso de biomarcadores o bioindicadores (Butterworth, 1995). Los biomarcadores son definidos como una respuesta biológica a componentes químicos que permita medir la exposición

y en algunos casos el efecto tóxico (Walker et al., 1996). La respuesta biológica sin embargo, puede ser bastante amplia y en diversos niveles, desde un receptor bloqueado a la función de un ecosistema dañado (Walker et al., 1996). La inhibición de la enzima AchE (específica de los insecticidas organofosforados y carbamatos), por ejemplo, es considerada un medidor de contaminación fácil y práctico de evaluar y es considerada un biomarcador para investigaciones de áreas o especies afectadas por la exposición a estos insecticidas (Walker et al., 1996).

Por último, se recomienda que la conducta sea considerada un indicador de contaminación, por efectos indirectos, ya que representa el resultado final de una diversidad de procesos bioquímicos y fisiológicos. Así un parámetro conductual puede ser más comprensible que un parámetro bioquímico o fisiológico. Sin embargo, actualmente los biomarcadores conductuales no son reconocidos ni aceptados como factores formales debido a la dificultad de ponderar parámetros de medición y evaluación, principalmente en el campo (Butterworth, 1995; Walker et al., 1996; Preston, 2002; Fleeger et al., 2003).

Aún así, es imprescindible que los estudios de ecotoxicología consideren factores de la ecología de la conducta de los organismos al momento de hacer evaluaciones y generar diagnósticos de impacto ambiental y del estatus de conservación de las especies (Sutherland, 1998, 2000; Caro, 1999, 2007). Se sugiere que los biomarcadores y bioindicadores podrían ser utilizados como herramientas para detectar parámetros perturbados en el monitoreo del ambiente y así evitar mayores daños y consecuencias en los ecosistemas (Walker et al., 1996; Baganz et al., 2001). De hecho, Baganz et al. (2001) ya ha propuesto herramientas y distintos análisis para utilizar la conducta de peces como potencial indicador de la contaminación del ambiente, lo que falta es su divulgación y utilización.

Mientras los plaguicidas sigan siendo utilizados y desechados descontroladamente, se debe evaluar, cuantificar y minimizar los daños que puedan ocasionar. Ya es sabido que el uso de contaminantes y la bioacumulación de éstos afecta procesos biológicos como: el desarrollo, el crecimiento, la conducta, la reproducción, la dinámica poblacional de las especies e incluso la supervivencia de los

organismos. Por lo que es necesario impedir que la suma de estos efectos sean acumulados a lo largo de las generaciones, ya que ocasionan una reducción del estatus de conservación o incluso la extinción de poblaciones de las especies expuestas a estos contaminantes.

## 10. Referencias Bibliográficas

- AGUILERA, L., Marquetti, M., Navarro A. & Bisset, Juan. 1995. Effects of three organophosphorus insecticides in the reproductive potential of *Culex quinquefasciatus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90(3)**: 411-413.
- ALBERT, L., 1985. *Curso Básico de Toxicología Ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud. Ed. ISBN 9275370060.
- ALCOCK, J. 1998. *Animal Behavior*. (6° ed.) Sunderland, MA: Sinauer. pp 765.
- AMUNDSEN, T. 2003. Fishes as a models in studies of sexual selection and parental care. *Journal of Fish Biology.* **63 (A)**: 17-52.
- ANDERSSON, M. & Simmons, W. L. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends Ecol. Evol.* **6**: 296-302.
- ANDERSSON, M. 1982. Sexual selection, natural selection and quality advertisement. *Biol. J. Linn. Soc.* **17**: 375-393.
- ANDERSSON, M. 1994. *Sexual Selection*. Princeton, New Jersey, USA. pp 599.
- ARELLANO-AGUILAR, O. & Macías G. C. 2008. Evaluación del efecto del metil paratión sobre el desempeño sexual del pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus*. Tesis de Doctorado. Instituto de ecología, UNAM. México.
- ARELLANO-AGUILAR, O. & Macías, G. C. 2009. Effects of Methyl Parathion Exposure on Development and Reproduction in the Viviparous Fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Environ. Toxicol.* **24(2)**: 178-86.
- ARRIAGA, C. L., Aguilar, S. V. & Alcocer, D. J. 2000. Aguas Continentales y diversidad biológica de México. CONABIO, México.
- ASPBURY, A. S. & Basolo, A. L. 2002. Repeatable female preferences, mating order and mating success in the poeciliid fish, *Heterandria formosa*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51(3)**: 238-244.
- BAATRUP, E. & Junge, M. 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environm. Health Perspect.* **109(10)**: 1063-1070.
- BAERENDS, G., Brouwer, R. & Waterbolk, H. 1955. Ethological studies in *Lebistes reticulatus* (Peters). I. An analysis of the male courtship pattern. *Behaviour.* **8**:249-335.
- BAGANZ, D., Staaks, G., Spieser, H. O. & Steinberg, C. E. W. 2001. How to use fish behavior analysis to sensitively asses the hazard potentials of environmental chemicals. En; *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of Environmental Change*. 2. Butterworth, F. M., Gunatilaka, A. & Gonshebbatt, M. E. (Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. pp 450.
- BASOLO, A. L. 1990. Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science.* **250**: 808-810.
- BELL, G. 1997. *Selection. The mechanism of evolution*. Oxford University Press, New York, USA. pp 553.
- BIANCHINI, A., Monserrat, J.M., 2001. Anticholinesterase Effect of Eserine (Physostigmine) in Fish and Crustacean Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 44:63-68.
- BISCHOFF, R., Gould, J. & Rubenstein, D. 1985. Tail size and female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **17**:253-255.
- BONFANTI, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzeto, I., ANDrioletti, M., Bachetta, R., Mantecca, P., Fascio, U., Vailati, G. & Vismara, C. 2004. Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology.* **70**: 189-200.
- BRADBURY, J. & Anderson, M. 1987. *Sexual selection: testing the alternatives*. A wiley-interscience publication. Great Britain.
- BREITHOLTZ, M. & Wollenberger, L. 2003. Effects of three PBDEs On the development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic toxicology.* **64**: 85-96.
- BRINK, P., Donk, E., Gylstra, R. Crum, S., & Brock, T. 1995. Effects of chronic low concentrations of pesticides chlorpyrifos and atrazine in indoor freshwater microcosms. *Chemosphere.* **31 (5)**: 3181-3200.
- BROOKS, R. 2006. Copying and the repeatability of mate-choice. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **39(5)**: 323-329.
- BUENO, J., Alexander, H., Mazari, M. & Piñero, D. 1996. Los residuos peligrosos y su impacto en los ecosistemas. En; *Los residuos peligrosos de México*. Octavio, R. Ponciano, R & González, S. Programa Universitario del Medio Ambiente PUMA. México.
- BURT DE PERERA, T. & Macías Garcia, C 2003. Amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*) use visual landmarks to orient in space. *Ethology.* **109**: 341-350.

- BUTTERWORTH, M. 1995. *Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press. New York. 313 pp.
- CAIRE, G. 2004. El manejo integral de cuencas en México: estudios y reflexiones para orientar la política ambiental. Helena Cotler (compilador), SEMARNAT-INE., pp.194.
- CALOW, P., 1998. *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell science Ltd. United Kingdom.
- CALUMPANG, F., Medina, M., Tejada, W. & Medina, R. 1997. Toxicity of chlorpyrifos, fenubucarb, monocrothopos, and Methyl parathion to fish and frogs after a simulated overflow of paddy water. *Bulletin of Environm. Contam. Toxicol.* **58**: 909-914.
- CANDOLIN, U. & Wong, B. 2008. Mate choice en MAGNHAGEN, C., Braithwaite, V., Forsgren, E. & Kapoor, B. 2008. *Fish Behaviour*. Science Publishers. pp 648.
- CARO, T. 1998. *Behavioral Ecology and Conservation Biology*. Oxford University press. pp 582.
- CARO, T. 1999. The behavior-conservation interface. *Tree*. **14**: 366-370.
- CARO, T. 2007. Behavior and conservation: a bridge too far? *Trends in Ecology and Evolution*. **22(8)**:394-400
- CARRANZA, J. 2009. Defining sexual selection as sex-dependent selection *Animal Behaviour*. **77**: 749-751.
- CASWELL, H. 2001. *Matrix population models. Construction, analysis and interpretation*. Second Ed. Sinauer Associates, USA.
- CONABIO. 2005. Programa de Medio Ambiente 1995-2000. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, SEMARNAT, México.
- CONSTANZ, G.1984. Reproductive biology of poeciliid fishes. En: *Ecology and Evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*(ed. G. K. Meffe and F. F. Snelson),Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. pp 33-50.
- DARWIN, C. 1859. *On the origin of species by means of Natural Selection*. John Murray. London, UK.
- DARWIN, C. 1871. *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray. London, UK.
- DAS, K. & Barone, S. 1999. Neuronal Differentiation in PC12 Cells is Inhibited by Chlorpyrifos and its metabolites: Is Acetylcholinesterase Inhibition the site of action?. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **160**: 217-230.
- DE KOGEL, C. 1997. Long-term effects of brood size manipulation on morphological development and sex-specific mortality offspring. *Journal of Animal Ecology*. **66**: 168-178.
- DE LA VEGA SALAZAR, M. & Macías Garcia, C 2003. Factores limnológicos y ecológicos asociados a la extinción de las especies de peces *Skiffia francesae* y *Zoogoneticus tequila*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 123.
- DE LA VEGA SALAZAR, M. & Macías Garcia, C 2005. Principal Factors in the Decline of the Mexican Endemic Viviparous Fishes (Goodeinae: Goodeidae). En; *Viviparous fishes*. Uribe, M. C. & Grier, H. J. (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida, USA. pp. 505-513.
- DE LA VEGA SALAZAR, M., Ávila-Luna, E. & Macías Garcia, C. 2003. Ecological evaluation of local extinction: the case of two genera of endemic mexican fish, *Zoogoneticus* y *Skiffia*. *Biod. and Conserv.* **12**: 2043-2056.
- DE LA VEGA SALAZAR, M., Tabche, L. M. & Macías Garcia, C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of freshwater community in Ignacio Ramirez dam in Mexico. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38**: 76-91.
- DEL VILLAR, A. 1949. Ictiología dulceacuícola Mexicana. *Rev. de la Soc. Mex. de Hist. Nat.* **10 (1-4)**: 309-337.
- DÍAZ-PARDO, E. 2005 The Gonopodial Suspension of the Girardinichtynae Fish. En: *Viviparous fishes*. Mari Carmen Uribe & Harry J. Grier (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida. pp 134-143.
- DÍAZ-PARDO, E. Godines-Rodríguez, M. A., López-López, E. & Soto-Galera, E. 1993. Ecología de los peces de la cuenca del Río Lerma, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de México*. **39**: 103-127.
- DOMINGUEZ-DOMINGUEZ, O. MARTINEZ-MEYER 2006. Using Ecological-Niche Modeling as a Conservation Tool for freshwater species: livebearing fishes in Central Mexico. *Conservation Biology*. **20** (6): 1730-1739.
- DOMINGUÉZ, O., Zambrano, L., Vázquez, L., Rodríguez-Pérez & Ponce de León, G. 2008. Cambio en la distribución de Goodeidos (Osteichthyes: Cyprinodontiformes: Goodeidae) en cuencas hidrológicas del centro de México. *Revista mexicana de Biodiversidad*. **79**.
- DUGATKIN, L. A. 1992. Sexual selection and imitation: females copy the mate choice of others. *The Americ. Natur.* **139(6)**: 1384-1389.
- DUGATKIN, L. A. 2004. *Principles of Animal Behavior*. W. W. Norton & Company, New York, USA. pp 642.
- DUNTEMAN, G., 1989. *Principal components analysis*. Sage University Paper, USA pp 96.
- DUQUESNE, S. 2006. Effects of an organophosphorate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **65**: 145-160.
- ECOTOXNET. 1996. Extension Toxicology Network: Pesticide Information Profile: methyl parathion.

- EDWARDS, F. L. & Tchounwou, P. B. 2005. Environmental Toxicology and Health Effects Associated with Methyl Parathion Exposure- A Scientific Review. *Int. J. Environ. Res Public Health*. **2(3)**: 430-411.
- ENDLER, J. 1980. Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*. **34**: 76-91.
- ENDLER, J. A. & McLellan. 1988. The process of evolution: Towards a newer synthesis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**: 395-421.
- EPA. 1999. Revised environmental fate and effects assessment for methyl parathion. Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. USA.
- FANTA, E., Rios, F. S., Romao, S., Vianna, A. C. & Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **54**: 119-130.
- FAVARI, L., López, E., Martínez-Tabche, L. & Díaz-Pardo, E. 2002. Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez Reservoir (Mexico): A biochemical and biomagnifications study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **51**: 177-186.
- FITZSIMONS, J. M., 1972. A revision of two genera of goodeid fishes (Cyprinodontiformes, Osteichthyes) from the Mexican Plateau. *Copeia*. **1972**: 728-756.
- FLEEGER, J., Carman, K. & Nisbet, R. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The science of the Total Environment*. **317**: 207-233.
- GARCÍA-REPETTO, R., Martinez, D & Repetto, M. 1997 Biodisposition study of the organophosphorus pesticide Methyl Parathion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **59**: 901-908.
- GARCÍA, S. J., Abu-Qare, A. W., Meeker-O'Connell, W. A., Borton, A. J. & Abou-Donia, M. B. 2003. Methyl Parathion: A review of health effects. *J. Toxicol Environ Health*. **6**: 185-210.
- GARCIA, S., Seidler, F & Slotkin, T. 2005. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **19**: 455-461.
- GESUNDHEIT, P. & Macías Garcia 2005. Biogeografía cladística de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes), pp 319-338. En: *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines*. J. Llorente Bousquets y J.J. Morrone (Eds.). Facultad de Ciencias, UNAM, México DF.
- GILDERHUS, P. 1990. Benzocaine as a fish anesthetic: efficacy and safety. *Prog. Fish Cult.* **52**: 189-191.
- GONZÁLEZ Zuart, C. & Macías Garcia, C. 2006. Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. *Proceedings of the Royal Society*. **273**: 301-307.
- GORMAN, H & Nager, R. 2004. Prenatal developmental conditions have long-term effects on offspring fecundity. *Proceedings of the Royal Society of London*. **271**: 1923-1928.
- GOULD, J. L. & Gould, C. G. 1997. *Sexual selection. Mate choice and Courtship in Nature*. Scientific American Library, New York, USA. pp 277.
- GRIFFITHS, S & Magurran, A. 1997. Familiarity in schooling fish: how long does it take to acquire? *Anim. Behav.* **53 (5)**: 945-949.
- GUZMÁN, A. M., Peniche, C. S. & Valdes, Z. A. 1995. La cuenca del Río Lerma y el Lago de Chapala.
- HAMILTON, W. & Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, New series **218**: 813-815.
- HAVENS, K. 1994. Insecticide (Carbaryl, 1-naphthyl-n-methylcarbamate) effects on a freshwater plankton community: zooplankton size, biomass and algal abundance. *Water, Air and Soil Pollution*. **84**: 1-10.
- HILL, G. 2000. Energetic constraints on expression of carotenoid-based plumage coloration. *Journal of Avian Biology*. **31**: 559-566.
- HINDE, A. 1998. Demographic Methods. Oxford University Press. London. pp. 305.
- HOAGLAND, K., Drenner, R., Smith, D., & Croos, D. 2009. Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **12(4)**: 627-637.
- HOUDE, A. E. & Endler, J. A. 1990. Correlated evolution of female mating preferences and male color patterns in the guppy *Poecilia reticulata*. *Science*. **248**: 1405-1408.
- HOUDE, A. E. 1997. *Sex, Color and Mate Choice in Guppies*. Princeton University Press. pp 210.
- HUGHES, K. A., Du, L., Rodd, F. H. & Reznick, D. N. 1999. Familiarity leads to female mate preference for novel males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Anim. Behav.* **58(44)**: 907-916.
- HURLBERT, S., Mulla, M & Willson, R. 1972. Effects of an organophosphorus insecticide on the phytoplankton, zooplankton and insect populations of freshwater ponds. *Ecological Monographs*. **42 (3)**: 269-299
- INEGI. 2003. Empleo de agroquímicos en los últimos seis años en la Cuenca Lerma-Chapala (fertilizantes nitrogenados, fosfatados, insecticidas y palguicidas). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.

- IUCN. 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Downloaded on September 2011.
- JAKANOVIC, M. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicol.* **166**: 139-160.
- JAWOR, M., & Breitwisch, R. 2003. Melanin ornaments, honesty, and sexual selection. *The Auk*. **120**: 249-265.
- JENNIONS, M. D. & Petrie, M. 1997. Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biolog. Rev.* **72(2)**: 283-327.
- KIME, D., 1995. The effects of pollution on reproduction fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* **5**: 52-96.
- KIRKPATRICK, M. 1982. Sexual Selection and evolution of female choice. *Evolution.* **36**: 1-12.
- KODRIC-BROWN, A. 1985. Female preference and sexual selection for male coloration in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **17**: 199-205.
- KOKKO, H., Brooks, R., Jennions, M. D. & Morley, J. 2003. The evolution of mate choice and mating biases. *Proc. Royal Soc. Lond, Series B.* **270**: 653-664.
- KREBS, J. R. & Davies, N. B. 1981, 1987, 1993. *An Introduction to Behavioural Ecology*. Wiley- Blackwell Synergy. Oxford University Press, New York, USA. pp 420.
- LANDE, R. & Arnold, S. 1984. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution.* **37**: 1210-1226.
- LASSITER, T., Padilla, S., Mortensen, S., Chanda, S., Moser, V. & Barone, S. 1998. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **152**: 56-65.
- LINDSTRÖM, K. & Mary, C. 2008. Alternative Reproductive Tactics in Fishes En; MAGNHAGEN, C., Braithwaite, V., Forsgren, E. & Kapoor, B. 2008. *Fish Behaviour*. Science Publishers. pp 648.
- LOMBARDI, J. & Wourms, J. P. 1985. The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish. I. Ultrastructure of internal ovarian epithelium, the maternal component. *J. Morphol.* **184**:277-292.
- LOSELY, G., Cronin, T., Goldsmith, T., Hyde, D., Marshall, N. & Mc Farland W. 1999. The UV visual world of fishes: a review. *Journal of Fish Biology.* **54(5)**: 921-943.
- MACÍAS GARCIA, C. & Burt de Perera, T. 2002. Ultraviolet-based female preferences in a viviparous fish. *Behav.Ecol. Sociobiol.* **52**:1-6.
- MACÍAS GARCIA, C. 1991. Sexual Behavior and trade-offs in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. Tesis de Doctorado, Universidad de East Anglia, Norwich, UK.
- MACÍAS GARCIA, C. 1994. Social behaviour and operational sex-ratios in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Copeia.* 919-925.
- MACÍAS GARCIA, C. 1998. Conducta conflicto sexual y especiación. En; *Bases neurobiológicas y ecológicas de la conducta*. Martínez-Gomes, M. & Velázquez-Moctezuma, J. Ed. UAT, UAM, UV, UNAM. Mexico. pp. 45-62.
- MACÍAS GARCIA, C., Jimenez, G. & Contreras, B. 1994. Correlational evidence of a sexually-selected handicap. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **35**: 253-259.
- MACÍAS GARCIA, C., Saborío, E. 2004. Sperm competition in a viviparous fish. *Environ. Biol. Fishes.* **70**: 211-217.
- MACÍAS-GARCIA, C. Saborío E. & Berea, C. 1998. Does male-biased predation lead to male scarcity in viviparous fish? *J. Fish Bio.* **53** (Suppl A): 104-117.
- MAGNHAGEN, C., Braithwaite, V., Forsgren, E. & Kapoor, B. 2008. *Fish Behaviour*. Science Publishers. pp 648.
- MAGURRAN, A. 2005. *Evolutionary ecology; The Trinidadian Guppy*. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press. pp 206.
- MARTIN, P & Bateson, P. 1986, 1993. *Measuring Behaviour*. Cambridge University Press. pp 222.
- McGRAW, K., & Ardia, D. 2003. Carotenoids, Immunocompetence, and the Information content of Sexual Colors: An experimental test. *American naturalist.* **162**:704-712.
- MEEK, S. E. 1904. A contribution to the ichthyology of Mexico. Field Columbian Museum, Publication 65 Zoological Series. **3(6)**: 63-128.
- MÉNDEZ, M. 2011. Relación entre la complejidad del cortejo y la tasa de especiación en la Subfamilia Goodeinae (Pisces: Cyprinodontiformes). Tesis de Grado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- MILINSKI, M. & Bakker, T. C. M. 1990. Female stickleback use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males. *Nature.* **344**: 330-333.
- MILLER, R. R. & Smith, M. L. 1986. Origin and geography of the fishes of Central Mexico. En: *Zoogeography of North America Fresh Water*. Hocutt, C.H. & Wiley, J. eds. Pp 487-517. New York.
- MILLER, R. R. 2005. *Freshwater fishes of Mexico*. The University of Chicago Press. USA. pp. 275-280.
- MORIATY, F.1999. *Ecotoxicology The study of pollutants in Ecosystems*. 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press.
- MORRIS, M. R. & Ryan, M. J. 1995. Large body size in the pygmy swordtails, *Xiphophorus pygmaeus*. *Biolog. J. Linnean Soc London.* 383-395.
- NARAYANA, K., Prashanti, N., Nayanatara, A., Kumar, S., Kumar, H., Baity, K. & Souza, U. 2006. A broad-spectrum organophosphate pesticide *O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate* (methyl parathion)

- adversely affects the structure and function of male accessory reproductive organs in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **22**: 315-324.
- NIMMO, R. & McEwen, C. 1994. Pesticides. In: *Handbook of Ecotoxicology*, Peter Calow (Ed.), 619-667, Blackwell Science Ltd.
- NORIEGA, N. & Haydes, T. 2000. DDT congener effects on secondary sex coloration in the reed frog *Hyperolius argus*: a partial evaluation of the *Hyperolius argus* endocrine screen. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B. **126**:231-237.
- NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM 059-SEMARNAT-2001. 2002. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación.
- O'DONALD, P. 1962. The theory of sexual selection. *Heredity* **17**: 541-552.
- O'DONALD, P. 1967. A general model of sexual and natural selection. *Heredity* **22**: 499-518.
- O'DONALD, P. 1973. Models of sexual and natural selection in polygynous species. *Heredity* **31**:145-156.
- OHLSSON, T. & Smith, H. 2002. Pheasant sexual ornaments reflect nutritional conditions during early growth. *Proceedings of the Royal Society of London*. **269**: 21-27.
- PAL, A. & Konar, S. 1985. Chronic effects of the organophosphorus insecticide DDVP on feeding, survival, growth and reproduction fish. *Environment and Ecology*. **3**: 398-402.
- PEARSON, K., 1901. On lines and planes of closest fit to systems of Points in Space. *Philosophical Magazine*, **2 (6)**: 559-572.
- PRESTON, B. 2002 Indirect effects in Aquatic Ecotoxicology: Implications for Ecological Risk Assessment. *Environmental Management*. **29**: 311-323.
- REYNOLDS, J. & Gros, M. 1990. Costs and benefits of female mate choice. *Am. Nat.* **136**: 230-243.
- RICK, I & Bakker, T. 2008. UV wavelengths make female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) more attractive for males. *Behav Ecol Sociobiol.* **62**: 439-445.
- RODD, F & Sokolowski, M. 1995. Complex origins of variation in the sexual behavior of male Trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*: interactions between social environment, heredity, body size and age. *An. Behav.* **49**: 1139-1159.
- ROEX, E., Keijzers, R. & Gestel, A. 2002. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebra fish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*. **64**: 451-460.
- ROMERO, H. 1965. Catálogo sistemático de los peces del Alto Lerma con descripción de una nueva especie. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Méx.* **14**: 47-80.
- ROSENTHAL, G. G., Evans, C. S. & Miller, W. L. 1996. Female preference for dynamic traits in the green swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Anim. Behav.* **51(44)**: 811-820.
- SABORÍO, F. E. 2002. Diferencias en la sustitución espermática en dos especies del género *Girardinichthys* (Familia: Goodeidae). Tesis Licenciatura (Biólogo), Facultad de ciencias, UNAM.
- SARGENT, R., Rush, V., Wisenden, B. & Yan, H. 1998. Courtship and mate choice in Fishes: Integrating Behavioral and Sensory Ecology.
- SARMA, S. S., Nandini, S., Gama-Flores, J. L., & Fernández-Araiza, A. M. 2001. Population growth of *Euchandis dilatata* (Rotifera): Combined effects of methyl parathion and food (*Chlorella vulgaris*). *J. Environ. Science Health*
- SCHINDLER, J. 2005. Digestion of embryotrophic protein in Goodeid teleosts. En: *Viviparous fishes*. Mari Carmen Uribe & Harry J. Grier (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida. pp 266-277.
- SCOTT, G. & Sloman, K., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and Physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*. **68**: 369-392.
- SHEEHAN, P. J., Miller, D. R., Butler, G. C. & Bourdeau, P. 1984. *Effects of pollutants at the ecosystem level*. Wiley. Scope22. British Library.
- SHUSTER, S. M. & Wade, M. J. 2003. *Mate systems and strategies*. Princeton University Press. pp 533.
- SMITH, E., Partridge, J., Parsons, K., White, E., Cuthill, I., Bennett, A. & Church, S. 2002. Ultraviolet vision and the mate choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav. Ecol.* **13(1)**: 11-19.
- SPARKES, T., Rush, V. & Foster, S. 2008. Reproduction costs, condition and carotenoid-based colour in natural populations of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecology of Freshwater Fish*. **17(2)**: 292-302.
- STARK, J. & Rangus, T. Lethal and sublethal effects of the neem insecticide formulation, "Margosan-O", on the aphid. *Pest Management Science*. **41(2)**: 155-160.
- SUTHERLAND, W. 1998. The importance of behavioral studies in conservation biology. *Animal Behaviour*. Review **56**: 801- 809.

- SUTHERLAND, W. 2000. *The Conservation Handbook: research, management and policy*. Blackwell Science Ltd. pp 277.
- TIMOFEEVA, O., Sanders, D., Seeman, K., Yang, L., Hermanson, D., Regenbogen, S., Agoos, S., Kallepalli, A., Rastogi, A., Braddy, D., Wells, C., Perraut, C., Seider, F., Slotkin, T & Levin, E. 2008. Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. *Brain Research Bulletin*. **77**: 404-411.
- TOFT, G & Baatrup, E. 2001. Sexual characteristics are altered by 4-*tert*-octylphenol and 17 $\beta$ -estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environm. Saf.* **48(1)**: 76-84.
- TORRES, R. & Velando, A. 2003. A dynamic trait affects continuous pair assessment in the blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **55**: 65-72.
- TRIVERS, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. En B. Campbell, ed. *Sexual Selection and the Descent of man*, 1871-1971, 136-179.
- URIBE, M. C. & Grier, H. J. 2005. *Viviparous fishes*. (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida, USA. pp. 217-235.
- URIBE, M. C., Rosa-Cruz, G., García Alarcón, A. 2005. The ovary of viviparous teleosts. Morphological differences between the ovaries of *Goodea atripinnis* and *Ilydon whitei* (Goodeidae). En; *Viviparous fishes*. Uribe, M. C. & Grier, H. J. (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida, USA. pp. 217-235.
- VITTOZZI, L., Fabrizi, L., Consigli, D.E. & Testai, E. 2001. Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environ. Intern.* **26**: 125-129.
- WAGNER, W. E. 1998. Measuring female mating preferences. *Anim. Behav.* **55**: 1029-1042.
- WALKER, H.C., Hopkin, P. S., Sibly, M. R. & Peakall, B.D. 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. London. pp. 321.
- WEBB S., Graves, J., Macías-García, C., Magurran, A., Folghil, D. & Ritchie, M. 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **30 (3)**: 527-544.
- WEBER, D. & Dingel, W., Panos, J. & Steinpreis, R. 1997. Alterations in Neurobehavioral responses in fishes exposed to lead and lead-chelating Agents. *American Zoology*. **37**: 354-362.
- WEISS, C. 1961. Physiological effects of organic phosphorus insecticides on several species of fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **90**: 143-152.
- WELSH, M. & Hanselka, C. 1972. Toxicity and sublethal effects of methyl parathion on behavior of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *The Texas Journal of Science*. **23(4)**: 519-529.
- WOURMS, J. 1981. Viviparity: the maternal-fetal relationship in fishes. *Am. Zoologist*. **21**: 473-515.
- ZAHAVI, A. 1975. Mate Selection-a Selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*. **53**: 205-214.

## 11. ANEXOS

Tabla 11.1. Matriz de correlaciones entre las variables de entrada del ACP.

Variables (ver figura 5.1.1)	1	2	3	4	5	6	A	B	C	D
1- Altura del pez	1.00	0.85	-0.17	-0.24	-0.30	-0.25	0.26	0.11	0.48	0.93
2- Longitud Estándar del pez	0.85	1.00	-0.06	-0.14	-0.19	-0.17	0.38	0.14	0.49	0.89
3- Largo de aleta dorsal	-0.17	-0.06	1.00	0.90	0.86	0.90	0.05	0.06	0.12	-0.17
4- Altura de aleta dorsal	-0.24	-0.14	0.90	1.00	0.91	0.89	0.01	0.04	0.09	-0.24
5- Altura de aleta ventral	-0.30	-0.19	0.86	0.91	1.00	0.91	0.06	0.08	0.05	-0.28
6- Largo de aleta ventral	-0.25	-0.17	0.90	0.89	0.91	1.00	0.07	0.09	0.08	-0.26
A- Diametro del ojo	0.26	0.38	0.05	0.01	0.06	0.07	1.00	0.23	0.30	0.33
B- Diametro de la pupila	0.11	0.14	0.06	0.04	0.08	0.09	0.23	1.00	0.15	0.15
C- Largo de aleta caudal	0.48	0.49	0.12	0.09	0.05	0.08	0.30	0.15	1.00	0.49
D- Altura de pedúnculo	0.93	0.89	-0.17	-0.24	-0.28	-0.26	0.33	0.15	0.49	1.00

Tabla 11.2. Discriminante de las variables entre machos y hembras en el ACP. Resultados significativos indican que la variable tiene importancia en el CP. Prueba de Wilks.

Variables (ver figura 5.1.1)	Machos		Hembras	
	F	p	F	p
1- Altura del pez	1.15	0.344	4.66	<b>0.001</b>
2- Longitud Estándar del pez	3.64	<b>0.006</b>	2.43	0.039
3- Largo de aleta dorsal	1.93	0.102	1.63	0.157
4- Altura de aleta dorsal	0.64	0.673	0.32	0.903
5- Altura de aleta ventral	1.85	<b>0.001</b>	4.43	0.116
6- Largo de aleta ventral	8.00	<b>0.000</b>	3.81	0.030
A- Diametro del ojo	2.63	0.032	5.58	<b>0.000</b>
B- Diametro de la pupila	3.32	0.010	1.73	0.133
C- Largo de aleta caudal	2.34	0.052	1.53	0.186
D- Altura de pedúnculo	3.87	0.004	1.75	0.128

Tabla.11.3. Componentes resultantes del Análisis de Componentes Principales-ACP para las medidas de coloración.

	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	CP 5	CP 6	CP 7
%	41.71	18.59	14.42	11.86	4.81	3.20	2.99
% acumulado	41.71	60.30	74.72	86.59	91.39	94.60	97.58
Valor propio	0.89	0.40	0.31	0.25	0.10	0.07	0.06

Tabla.11.4 Análisis de varianza-ANOVA en la coloración del pez *Girardinichthys multiradiatus*. Coloraciones de UV, A-Amarillo, R-Rojo y CT-saturación espectral de Croma Total en aletas, cuerpo y aleta caudal-cola, de machos y hembras en tres generaciones.

Ch	1	2	3-Sexo		1-Gener		2-Sexo		3-Trat		Int 1-2		Int 1-3		Inter 2-3		Int 1-2-3	
			Hembr	Macho	F <sub>1,219</sub>	P	F <sub>1,219</sub>	p	F <sub>1,219</sub>	P	F <sub>1,219</sub>	P	F <sub>1,219</sub>	P	F <sub>1,219</sub>	p	F <sub>1,219</sub>	P
Aletas	UV		$\bar{x} \pm e.e.$	$\bar{x} \pm e.e.$	189.754	<b>0.000</b>	4.007	<b>&gt;0.05</b>	24.718	<b>&gt;0.005</b>	-	-	22.470	<b>0.000</b>	-	-	-	-
	F1	C	0.126 ± 0.000	0.126 ± 0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		E	0.126 ± 0.000	0.126 ± 0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F2	C	0.126 ± 0.000	0.125 ± 0.001	-	-	-	6.45 <sup>δc</sup>	<b>0.02</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		E	0.127 ± 0.001	0.127 ± 0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F3	C	0.120 ± 0.001	0.112 ± 0.002	-	-	26.98 <sup>d</sup>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		E	0.120 ± 0.001	0.115 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A				208.568	<b>0.000</b>	5.029	<b>0.026</b>	-	-	0.3270	<b>0.0430</b>	3.282	<b>0.039</b>	4.130	<b>0.043</b>	-	-
	F1	C	0.366 ± 0.000	0.365 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		E	0.366 ± 0.000	0.365 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F2	C	0.368 ±	0.368 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

			0.001	0.002														
	E		0.368 ±	0.366 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001	0.001														
	F3	C	0.386 ±	0.396 ±	-	-	-	-	7.74 <sup>δe</sup>	<b>0.01</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.003	0.005														
	E		0.385 ±	0.385 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.002	0.002														
R					109.833	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F1	C	0.279 ±	0.280 ±	-	-	9.48 <sup>a</sup>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000	0.001														
	E		0.279 ±	0.280 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000	0.000														
	F2	C	0.277 ±	0.277 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001	0.001														
	E		0.276 ±	0.277 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001	0.001														
	F3	C	0.267 ±	0.267 ±	-	-	-	-	4.97 <sup>δe</sup>	<b>&lt;0.05</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001	0.002														
	E		0.264 ±	0.270 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.003	0.001														
CT					244.242	<b>0.000</b>	-	-	90.045	<b>0.000</b>	5.814	<b>&lt;0.005</b>	82.099	<b>0.000</b>	4.328	<b>0.039</b>	3.946	<b>0.021</b>
	F1	C	0.477 ±	0.539 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.034	0.051														
	E		0.532 ±	0.432 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.027	0.033														
	F2	C	0.613 ±	0.604 ±	-	-	-	-	5.64 <sup>δc</sup>	<b>0.03</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.039	0.027														
	E		0.652 ±	0.760 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.040	0.049														
	F3	C	0.845 ±	1.859 ±	-	-	122.34 <sup>d</sup>	<b>0.000</b>	11.84 <sup>δe</sup>	<b>0.02</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.084	0.100														
	E		0.835 ±	1.510 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.050	0.052														
Cuerpo	UV				75.948	<b>0.000</b>	-	-	8.228	<b>&lt;0.005</b>	-	-	6.823	<b>&lt;0.005</b>	-	-	-	-
	F1	C	0.126 ±	0.126 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000	0.000														
	E		0.126 ±	0.125 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000	0.000														
	F2	C	0.127 ±	0.126 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001	0.001														
	E		0.126 ±	0.127 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001	0.000														

A M	F3	C	0.122 ± 0.001	0.116 ± 0.002	-	-	8.55 <sup>d</sup>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-		
		E	0.122 ± 0.001	0.120 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
					90.313	<b>0.000</b>	-	-	10.856	<b>&lt;0.005</b>	-	-	16.546	<b>0.000</b>	9.184	<b>&lt;0.005</b>	5.248	<b>0.006</b>
	F1	C	0.367 ± 0.001	0.366 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		E	0.367 ± 0.001	0.367 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F2	C	0.366 ± 0.002	0.368 ± 0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E		0.367 ± 0.002	0.364 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
F3	C	0.374 ± 0.001	0.376 ± 0.001	-	-	12.58 <sup>d</sup>	<b>0.00</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E	0.391 ± 0.006	0.380 ± 0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
R O				12.645	<b>&lt;0.005</b>	-	-	-	-	-	-	9.310	<b>&lt;0.005</b>	4.609	<b>0.033</b>	-	-	
F1	C	0.279 ± 0.001	0.280 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E	0.279 ± 0.001	0.280 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
F2	C	0.277 ± 0.002	0.277 ± 0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E	0.275 ± 0.001	0.278 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
F3	C	0.280 ± 0.002	0.268 ± 0.004	-	-	6.52 <sup>d</sup>	<b>0.01</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E	0.277 ± 0.001	0.274 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CT				16.910	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	14.052	<b>&lt;0.005</b>	-	-	-	-	
F1	C	1.067 ± 0.084	1.055 ± 0.072	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E	1.188 ± 0.055	1.033 ± 0.089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
F2	C	1.121 ± 0.093	1.106 ± 0.066	-	-	4.03 <sup>b</sup>	<b>&lt;0.05</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E	0.820 ± 0.058	1.013 ± 0.077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
F3	C	1.038 ±	1.753 ±	-	-	18.32 <sup>d</sup>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

		0.096 0.090															
		E 1.262 ± 1.497 ±															
		0.052 0.113															
Cola	UV			37.805	<b>0.000</b>	4.332	<b>0.039</b>	6.475	<b>0.012</b>	-	-	15.405	<b>&lt;0.005</b>	-	-	-	-
	F1	C	0.125 ± 0.126 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001 0.000														
		E	0.126 ± 0.126 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000 0.001														
	F2	C	0.123 ± 0.126 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.005 0.001														
		E	0.125 ± 0.126 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001 0.001														
	F3	C	0.120 ± 0.111 ±	-	-	33.98 <sup>d</sup>	<b>0.00</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.002 0.002														
		E	0.124 ± 0.114 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001 0.001														
	A			30.829	<b>0.000</b>	4.682	<b>0.032</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M																
	F1	C	0.366 ± 0.366 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001 0.001														
		E	0.365 ± 0.366 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000 0.001														
	F2	C	0.379 ± 0.370 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.013 0.003														
		E	0.370 ± 0.368 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.002 0.001														
	F3	C	0.387 ± 0.395 ±	-	-	5.51 <sup>d</sup>	<b>0.02</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.007 0.006														
		E	0.377 ± 0.388 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.003 0.002														
	R			24.698	<b>0.000</b>	4.015	<b>0.046</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O																
	F1	C	0.281 ± 0.280 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001 0.001														
		E	0.281 ± 0.280 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.000 0.001														
	F2	C	0.268 ± 0.275 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.010 0.002														
		E	0.276 ± 0.279 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.001 0.002														
	F3	C	0.266 ± 0.264 ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.004 0.004														

	E	0.271 ± 0.002	0.268 ± 0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT				62.110	<b>0.000</b>	-	-	26.251	<b>&lt;0.005</b>	-	-	33.343	<b>0.000</b>	-	-	-
F1	C	0.521 ± 0.061	0.491 ± 0.035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	0.582 ± 0.048	0.455 ± 0.044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	C	0.716 ± 0.174	0.612 ± 0.031	-	-	-	-	17.76 <sup>♂c</sup>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-
	E	0.715 ± 0.087	0.848 ± 0.040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F3	C	0.849 ± 0.144	1.620 ± 0.141	-	-	82.55 <sup>d</sup>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	0.666 ± 0.067	1.720 ± 0.112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

g.l.: <sup>a</sup>=1,104; <sup>b</sup>=1,54; <sup>c</sup>=1,16; <sup>d</sup>=1, 64; <sup>e</sup>=1,22; <sup>♂</sup>= en machos.

Tabla 11.5. Promedio de críos nacidos, supervivientes, muertos y con malformaciones congénitas para el grupo control y grupo experimental expuesto a MeP en todas las generaciones y en cada una separadamente del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

G		Nacidos		Supervivientes		Muertos		Malformados	
		$\bar{x} \pm e.e.$	F; $p$	$\bar{x} \pm e.e.$	F; $p$	$\bar{x} \pm e.e.$	F; $p$	$\bar{x} \pm e.e.$	F; $p$
F2-	C	9.68 ± 0.98	F <sub>1,118</sub> =2.36	6.42 ± 0.814	F <sub>1,118</sub> =1.87	3.25 ± 0.48	F <sub>1,118</sub> =14.54	0.38 ± 0.15	F <sub>1,118</sub> =1.19
F3-	E	11.65 ± 0.76	$p=0.127$	4.91 ± 0.667	$p=0.174$	6.74 ± 0.60	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>	1.51 ± 0.03	<b><math>p &lt; 0.005</math></b>
F4									
F2	C	10.52 ± 1.23	F <sub>1,69</sub> =1.20	6.79 ± 1.08	F <sub>1,69</sub> =0.90	3.72 ± 0.61	F <sub>1,69</sub> =5.59	0.41 ± 0.20	F <sub>1,69</sub> =4.96
	E	12.93 ± 1.22	$p=0.182$	6.31 ± 1.11	$p=0.765$	6.62 ± 0.92	<b><math>p &lt; 0.005</math></b>	1.62 ± 0.43	<b><math>p &lt; 0.005</math></b>
F3	C	7.11 ± 1.27	F <sub>1,37</sub> =3.47	5.22 ± 0.80	F <sub>1,37</sub> =3.47	1.89 ± 0.65	F <sub>1,37</sub> =8.64	0.22 ± 0.22	F <sub>1,37</sub> =1.90
	E	10.83 ± 0.98	$p=0.061$	3.57 ± 0.70	$p=0.06$	7.27 ± 0.91	<b><math>p &lt; 0.005</math></b>	1.00 ± 0.30	$p=0.176$
F4	C	9.00 ± 6.00	F <sub>1,8</sub> =0.66	6.50 ± 3.50	F <sub>1,8</sub> =1.99	2.50 ± 2.50	F <sub>1,8</sub> =2.10	0.50 ± 0.50	F <sub>1,8</sub> =1.59
	E	8.00 ± 1.48	$p=0.803$	2.63 ± 1.13	$p=0.196$	5.38 ± 0.82	$p=0.185$	2.88 ± 0.90	$p=0.25$

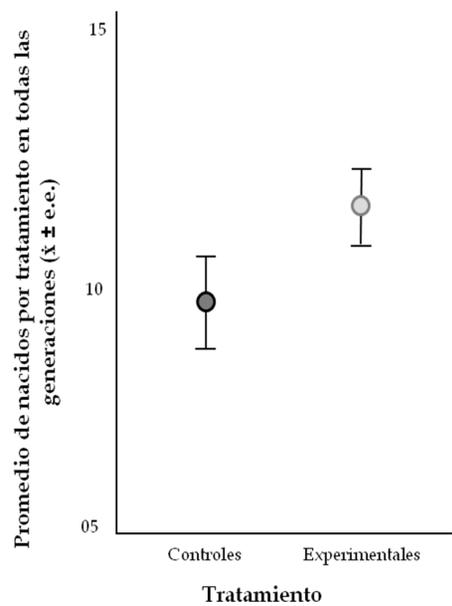


Fig. 11.7.1. Promedio de supervivencia de críos en todas las generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

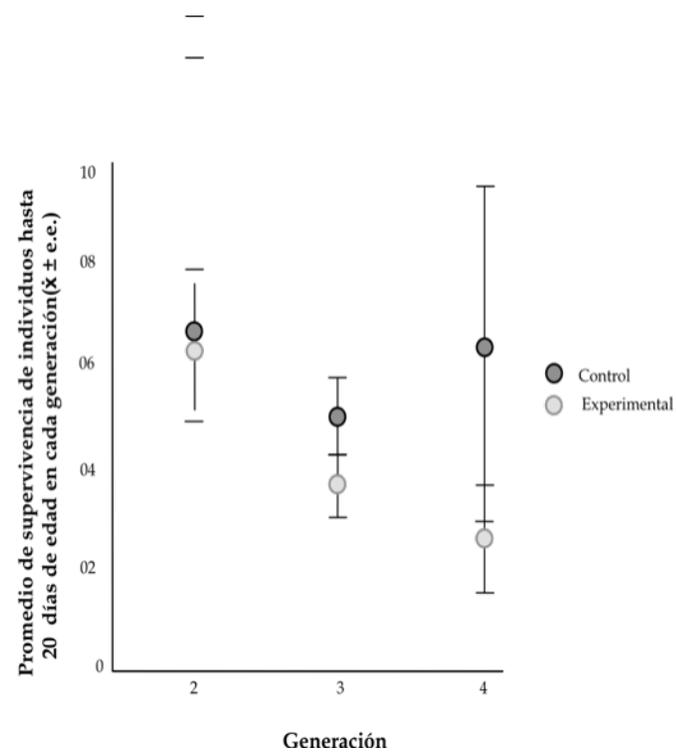


Fig.11. 7.2. Promedio de supervivencia de críos en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

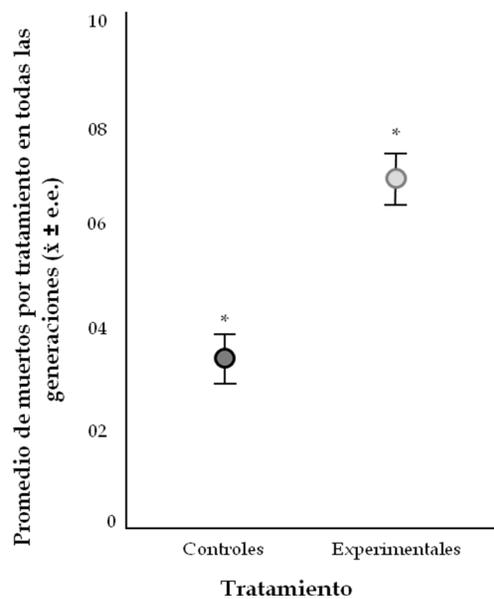


Fig. 11.7.3 Promedio de críos muertos en todas las generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

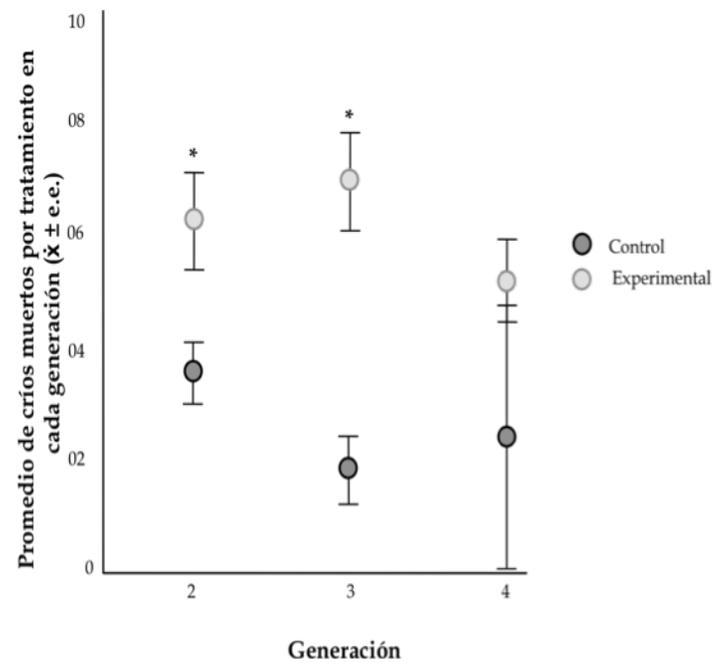


Fig.11.7.4. Promedio de críos muertos en cada generación del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

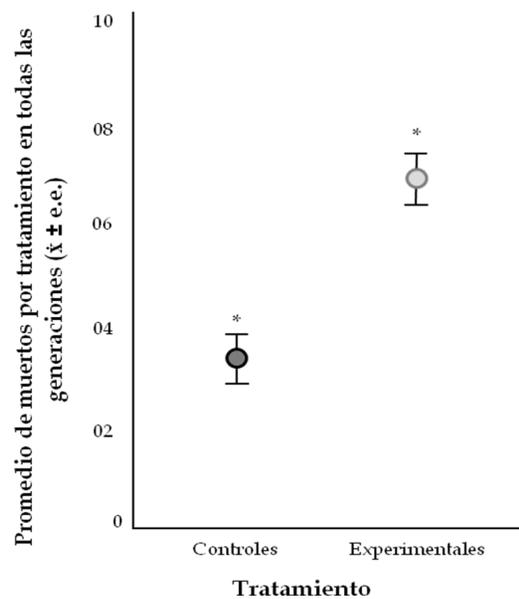


Fig. 11.7.5. Promedio de críos con malformaciones congénitas por tratamiento en todas las generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.

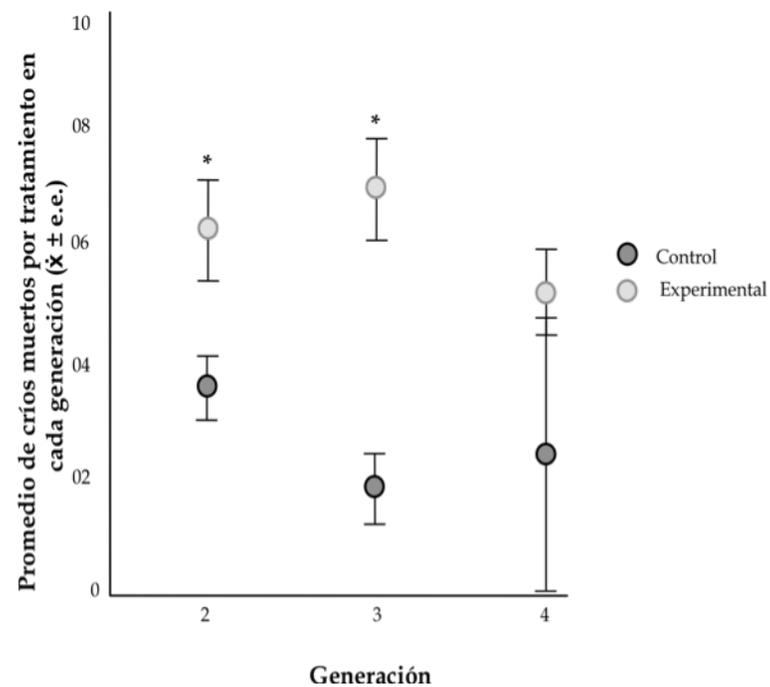


Fig.11.7.6. Promedio de críos con malformaciones congénitas en tres generaciones del pez *Girardinichthys multiradiatus*.