



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

RELACIONES DE PARENTESCO EN 6 ESPECIES DE
ROBALOS (PISCES: CENTROPOMIDAE)
ESTABLECIDAS MEDIANTE ANÁLISIS DE
ISOENZIMAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ALMA DELIA HERNÁNDEZ PÉREZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. PINDARO DIAZ JAIMES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Relaciones de parentesco en 6 especies de robalos (Pisces: Centropomidae)
establecidas mediante análisis de isoenzimas".

realizado por Alma Delia Hernández Pérez

con número de cuenta 9350780-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Píndaro Díaz Jaimes.

Propietario

Dr. Manuel Uribe Alcocer.

Propietario

M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo.

Suplente

Biol. Maria de Lourdes Barbosa Saldaña.

Suplente

M. en C. Yolanda Hortelano Moncada.

**FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.**

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA**

298396

A mis Papas,
mi respeto por ese corazón tan grande
y mi admiración por que a partir de nada han construido todo,

A Mónica, por tu fuerza y valentía,
dijiste lo que nadie se atrevió a decir.

A Saúl, gracias por estar ahí...

A mi Oliver, nunca dejes de soñar...

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Manuel Uribe por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio, por su constante apoyo, y por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.

Al Dr. Píndaro Díaz, mi más sincero agradecimiento por el apoyo y la paciencia, obviamente gracias por el interés en la realización y la dirección de esta tesis.

A la M. en C. Yolanda Hortelano del laboratorio de Mastozoología del Instituto de Biología, por sus importantes aportaciones en la revisión del presente trabajo.

Al M. en C. Ernesto Mendoza por la disposición en la revisión, y la ayuda en la identificación de los peces.

Al Dr. Albert van der Heiden, al Biol. Héctor Plascencia y Biol. Marcela Ruiz del Laboratorio de Genética del CIAD de Mazatlán, por la donación de algunas muestras de tejido de robalos; a Don Felipe por la ayuda en la búsqueda del material biológico.

A las autoridades del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de esta Universidad por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

A los cuates del laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, por todos esos agradables momentos: Eva, Edson y Fernando; Lupita y Lulú (gracias por la revisión), muchas gracias a las dos por los ánimos.

A todas las personas que hacen posible que ADIVAC exista, en especial a Kathia... sabes, esta vez no voy a darte las gracias, solo puedo extender mi admiración a tu excelente trabajo y a tu disposición de ayudar.

A los cuates de la Facultad, a Sophia, a la Reme, a Jessica, a Amelia, a Lolita, a Alejandra, al Marco, por todos los ratos padres que pasamos juntos.

A Eli y su familia.

A los cuates del voly. A Chela; a Isa y Marina (con todo y beba), muchas gracias a las dos por todo.

Al tío Chucho, Ramón, al tío Arnulfo, al Sr. Mundo y sus respectivas familias, por su ejemplo de fortaleza.

A todas las personas que de una u otra manera han influido en esto

Pueden arrebatarte tu integridad,
pueden hacer que te sumerjas en un silencio
en el que sientes agonizar hasta que te pierdes.....
te sepultan en ese silencio que lo llena todo
dejándote en una oscuridad eterna
en donde no ves, no hablas, no oyes, no sientes....
solo te queda una voz sin sentido que nadie escucha,
una mirada apagada, angustia, olvido, ausencia,
miedo, desesperanza, un alma vacía

y ESTOY aquí

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
<i>ANTECEDENTES</i>	4
- Diagnósis	5
- Biología	5
- Electroforesis	8
- Codificación de caracteres	10
- Inferencia filogenética	11
- Sistemática del Género	14
<i>OBJETIVOS</i>	20
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	21
<i>RESULTADOS</i>	28
<i>DISCUSIÓN</i>	44
<i>CONCLUSIONES</i>	54
<i>LITERATURA CITADA</i>	55

LISTA DE FIGURAS

1. Ubicación taxonómica de los Centropomidos (Amezcuca, 1996; Nelson, 1994).
2. Diagnósis de *Centropomus undecimalis*.
3. Diagnósis de *Centropomus viridis*.
4. Diagnósis de *Centropomus nigrescens*.
5. Diagnósis de *Centropomus mexicanus*.
6. Diagnósis de *Centropomus robalito*.
7. Diagnósis de *Centropomus medius*.
8. Hipótesis filogenética propuesta por Rivas (1986) basada en caracteres de morfología.
9. Hipótesis filogenética propuesta por Tringali *et al.*, 1999: A) mediante el método de parsimonia para datos electroforéticos. B) mediante el método de mínima evolución basado en los datos del gen 16 S del rRNA.
10. Localidades de colecta de las seis especies de Centropomidos analizadas.
11. Patrón electroforético en la fumaras (FH).
12. Variación en la 6-Fosfoglucomutasa deshidrogenasa (6-PGD), una enzima dimérica.
13. Variación en la Glucosa fosfato isomerasa, una enzima dimérica, codificada por dos loci.
14. Patrón electroforético en la L-leucil-L-alanina.
15. Cladograma inferido mediante análisis de "maximum-likelihood" utilizando a las frecuencias alélicas como caracteres continuos y transformados a valores de distancias genéticas.
16. Cladograma de consenso inferido mediante análisis de "maximum-likelihood" utilizando 1000 réplicas por bootstrap.
17. Árbol obtenido mediante el análisis de Neighbor-joining y como resultado de las frecuencias génicas transformadas a distancias genéticas (Nei, 1972).
18. Árbol resultado del análisis de parsimonia de Wagner. Los alelos fueron tratados como caracteres. Este es el cladograma de consenso de mayoría del análisis de reemuestreo por "bootstrap" mediante 100 réplicas.
19. Árbol consenso para el análisis de parsimonia con 24 caracteres. Los números en los nodos indican las frecuencias de ocurrencia de los grupos de acuerdo con el análisis de bootstrap.

El género *Centropomus* es un grupo de peces formado por doce especies (Rivas, 1986), que habita en aguas marinas costeras, en esteros, en ríos y lagunas de los trópicos y subtropicos de América (Rivas 1986, Quiroga *et al.*, 1996, FAO 1978,1995); en México, se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de ambos litorales, donde es objeto de una importante demanda pesquera (Chávez 1963, Quiroga 1996, Muhlia-Melo *et al.*,1995). De acuerdo a la región del país en el que se distribuyan, los Centropomidos son conocidos con distintos nombres comunes, tales como robalo, robalito, constantino, chucumite, etc.

Los robalos presentan una abundancia considerable en México y se ubican como uno de los productos nacionales de escama mejor cotizados y más importantes. Se pescan en todos los estados costeros del Pacífico, aunque en Baja California y Sonora la producción es muy incipiente. En el litoral del Golfo de México las zonas de mayor captura son las costas de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche.

Según el Anuario estadístico de Pesca (Instituto Nacional de Pesca,1997), entre 1987 y 1997 la producción nacional de los Centropomidos fluctuó entre 3372 (en 1990) y 5132 ton (en 1997), con un promedio anual de 4368 ton; el 84 % se capturó del litoral del Golfo de México y del Mar Caribe; mientras que el volumen registrado en el Pacífico es muy inferior al del Atlántico: sólo el 16%. Quiroga *et al* (1996) mencionan que "esta mayor abundancia de peces en el Golfo de México se debe principalmente al aporte de gran cantidad de corrientes fluviales, ya que solo en el estado de Veracruz cuenta con el 26% del drenaje Nacional".

En nuestro país, a pesar de la relevancia de la pesquería de los robalos, no ha existido una investigación suficiente sobre este recurso. Las publicaciones realizadas son enfocadas principalmente a aspectos biológicos (Chávez, 1963; Taylor *et al*, 1998; Gilmore *et al*, 1983; Peterson *et al*, 1991; Pérez-Pinzón *et al*, 1991; Jiménez, 1984). Siendo que son especies con valor comercial y con un impacto social en la comunidades surge la necesidad de establecer políticas de administración pesquera que no han sido concretadas por que en la pesca no se considera de manera separada a las especies, lo que impide establecer políticas de administración efectiva. Es necesario pues, que las investigaciones se dirijan a aspectos que enriquezcan nuestro conocimiento sobre dichas especies, y entre los más importantes que deben ser abordados se encuentran: 1) la definición del número de especies y sus relaciones dentro del género; 2) la profundización en las investigaciones sobre aspectos básicos de biología y ecología de estas especies, por ejemplo el caso del robalo prieto (*C. poeyi*) la cual

es endémica del Golfo de México (Fuentes, 1973; Castro A. 1978; Rivas, 1986; Muhlia-Melo, 1994); 3) ahondar en la biología pesquera de los robalos en general

En los últimos años ha habido un incremento en la explotación de este recurso ocasionado principalmente por su gran valor comercial, la predilección de los consumidores, y por la accesibilidad para su pesca; además de que las capturas masivas coinciden con las concentraciones de robalos en su época de reproducción, cuando se reúnen para desovar (Quiroga *et al.*, 1996). Lo anterior aunado al desconocimiento de las especies capturadas, a la carencia de información sobre su biología pesquera y a la ausencia de programas de administración, pueden ser motivo de que sus poblaciones y su acervo genético se encuentren en riesgo.

Con el objeto de evitar los riesgos causados por la carencia de políticas de administración de la pesquería, es de gran importancia establecer criterios que permitan planificar su aprovechamiento y conservar el recurso. Las medidas más frecuentes, dirigidas a la conservación de los recursos pesqueros son principalmente, el establecimiento de vedas, de tallas mínimas de captura, regulación en el tamaño de la luz de malla, y las cuotas de captura (Fuentes, 1996). Es importante también tomar medidas para la conservación de la diversidad genética (la suma total de información en los genes de organismos individuales de una especie) (Smith, 1994). La aplicación de la genética en aspectos pesqueros tiene gran importancia, debido a que la abundancia y características en las poblaciones pesqueras no pueden ser sustentadas únicamente mediante el equilibrio entre las capturas y el reclutamiento de individuos, ya que la captura puede modificar la composición genética de estas poblaciones sujetas a explotación (Allendorf *et al.*, 1987).

Uno de los primeros aspectos a definir para preservar los recursos pesqueros es el reconocimiento de las especies explotadas por las pesquerías; en el caso de los robalos, el desconocimiento mismo del número de especies del género que se distribuyen en el país y que sustentan la pesquería, al igual que la carencia de métodos confiables y eficaces que lleven a la identificación adecuada de las especies capturadas, son una limitante para poder establecer estas medidas de conservación y aprovechamiento de una manera ideal.

La identificación de especies que muestran gran similitud morfológica, ha sido apoyada por técnicas como la electroforesis (Shaklee y Tamaru, 1981; Shaklee *et al.*, 1982; Avise 1975 y 1994). Este método aporta información sobre la expresión directa de los genes que se manifiestan en patrones de bandas mediante los cuales es posible detectar diferencias a nivel individual y poblacional, lo que ha permitido estimar el grado de diferenciación genética entre especies estrechamente relacionadas en varios grupos de organismos (Hillis *et al.*, 1983;

Shaklee *et al.*, 1981 y 1982; Dowling y Brown, 1989; Dobzhansky *et al.*, 1993; Tringali *et al.*, 1999a y 1999b).

Algunos de los principales objetivos de la sistemática son el reconocimiento y la explicación de las relaciones de parentesco (genealogía), de la similitud y de la distribución de los caracteres entre los organismos (Llorente y Vega, 1994), los cuales son resultado de los procesos evolutivos que se intentan estudiar mediante las propuestas de hipótesis de genealogía. Las relaciones evolutivas se definen como un proceso de genealogía entre grupos ancestrales y descendientes; es decir, que todos los seres vivos están relacionados en mayor o menor grado y mediante la propuesta de una hipótesis se intenta descifrar los aspectos de su historia evolutiva (Villaseñor y Dávila, 1992).

Hay dos principales tipos de especiación: los que involucran la disrupción física del flujo génico por aislamiento geográfico (alopátricos) y aquellos que no requieren aislamiento para que la especiación ocurra (no alopátricos o simpátricos). En el caso de la especiación alopátrica no se requieren cambios adaptativos para iniciar la especiación dado el surgimiento de una barrera geográfica. En la especiación simpátrica se origina una especie a partir de una o más especies ancestrales en ausencia de una separación geográfica, y puede producirse por hibridación, mutaciones, poliploidía, etc (Morrone, 2001). El acontecimiento clave para que ocurra la especiación es el aislamiento genético. Una vez que las especies han quedado aisladas genéticamente, pueden habitar nuevamente la misma área sin posibilidades de entrecruzamiento, debido a los numerosos y complejos mecanismos anatómicos, fisiológicos y de comportamiento experimentados (Curtis y Barnes, 1993).

De la cantidad de diferenciación genética entre las especies puede inferirse su filogenia. La evolución es un proceso de cambio y diversificación de los organismos a través del tiempo; a nivel genético se da por procesos con los que aparecen las variaciones hereditarias, tales como las mutaciones o recombinaciones, y factores como la deriva génica y la selección actúan sobre estas variaciones genéticas transmitiéndolas de manera diferencial de generación en generación. Siendo la evolución un proceso gradual, es más probable que las especies que son genéticamente más parecidas tengan un antepasado común más reciente que las que son genéticamente más diferentes (Ayala y Kiger, 1984).

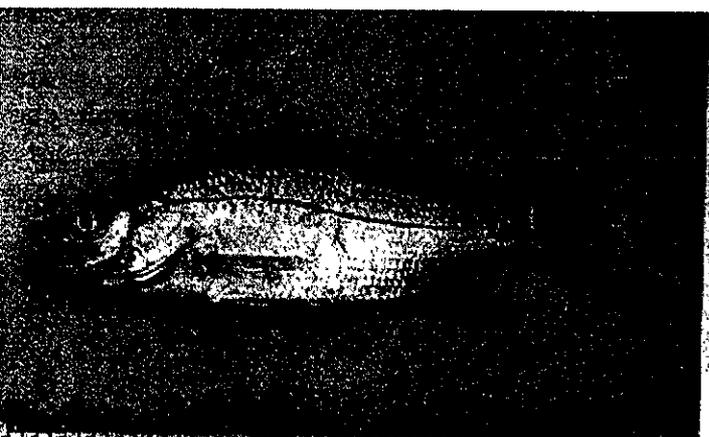
La filogenia ocupa un lugar fundamental en la sistemática y taxonomía pues apoya la resolución de problemas referentes con la posición taxonómica y nomenclatura de las especies; aportando también elementos básicos en estudios de su ecología y su evolución; de esta manera, "la reconstrucción filogenética se podría considerar como un objetivo central en la biología, ya que la filogenia le da sentido y perspectiva a la información que generan las diferentes ramas de la biología" (Eguiarte *et al.*; 1997).

La familia Centropomidae según Greenwood (1976) está conformada por las subfamilias Centropominae y Latinae. La subfamilia Centropominae comprende sólo el género *Centropomus* y la Latinae incluye los géneros *Lates* y *Psamnopectera*.

El género *Centropomus* es un grupo compacto y homogéneo, muy distinto a los otros dos géneros de la familia, encontrándose sólo en los litorales tropicales y subtropicales de América, mientras que *Lates* y *Psamnopectera* se distribuyen sólo en África y en el Indo pacífico (Rivas 1986).

De acuerdo con Greenwood (1976), los ancestros más cercanos de los Centropómidos pertenecientes a la subfamilia Latinae, se originaron en la era Cenozoica, entre las épocas del Paleoceno–Eoceno, esto es, hace aproximadamente 54–60 millones de años; como lo muestran los registros fósiles encontrados en ambientes marinos de distintas localidades de África y Europa. Este autor propone en su hipótesis sobre la distribución del género *Lates*, que los ancestros de hábitats marinos iniciaron la invasión de aguas continentales en África, que posteriormente se dispersaron a través de distintos sistemas ribereños, y algunas poblaciones aisladas comenzaron a evolucionar en especies ahora extintas y otras que han sobrevivido en hábitats de agua dulce en ese continente.

UBICACIÓN TAXONÓMICA



Clase	Osteichthyes
Infraclase	Teleostei
División	Euteleostei
Superorden	Acanthopterygii
Orden	Perciformes
Suborden	Percoidei
Familia	Centropomidae
Género	<i>Centropomus</i> Lacépède, 1802.

Figura 1. Ubicación taxonómica de los Centropómidos (Amezcuá, 1996; Nelson, 1994). La foto es un individuo de *Centropomus robalito* (Tomado de Amezcuá, 1996).

- **Diagnosís del Género.**

Los peces del género *Centropomus* se caracterizan por presentar el cuerpo de alargado a oblongo y comprimido, perfil predorsal recto o cóncavo a nivel de hocico o de los ojos. Boca grande y protáctil, mandíbula inferior prominente; numerosos dientes de tipo granular dispuestos a manera de franjas en ambas mandíbulas y en el paladar, borde del preopérculo aserrado, con uno a cinco denticulos más grandes en el ángulo, opérculo sin espinas, borde ventral de la placa suborbitaria aserrado. Dos aletas dorsales separadas; la primera con VIII fuertes espinas, la segunda con una espina y 8 a 11 radios (generalmente 9 o 10) blandos. Aletas pélvicas situadas por debajo de las pectorales cuyos extremos alcanzan o sobrepasan el ano. Escamas medianas a grandes, del tipo ctenoides; línea lateral extendida hasta el borde posterior de la aleta caudal. Coloración del dorso: café verdoso o gris azulado en el vientre, y flancos plateados, la línea lateral es negra en algunas especies, coloración que puede desaparecer en ejemplares preservados, membranas interespinosas de la primera aleta dorsal y de la anal en ocasiones negras, las demás aletas predominantemente cenicientas (FAO, 1995).

La diagnosís de cada una de las especies colectadas se presentan a continuación, en dichas diagnosís se mencionan a los caracteres morfológicos que fueron más determinantes en la identificación de estas especies (Figura 2 – 7).

- **Biología**

Los Centropómidos en general son especies demersales (viven próximos al fondo), eurihalinas (de gran tolerancia a la salinidad), diádromos (migran entre el mar y las aguas dulces) y estuarino dependientes, encontrándose en salinidades que van de 0 a 25 ppm. Según Rivas (1986) estos peces son termofilicos (prosperan bien a elevadas temperaturas), distribuyéndose en ambientes tropicales y subtropicales; la temperatura y la salinidad son los factores ambientales que tienen mayor influencia en su abundancia y distribución ecológica.

Su grado de tolerancia a la salinidad es muy amplio, algunos viven indistintamente en el mar, en ríos o en masas de agua dulce, y se encuentran con mayor frecuencia en los esteros. Chávez (1963) reporta rangos de salinidad desde el agua dulce hasta 31.6 ppm; Jiménez (1984) realizó capturas en salinidades que van de 0 a 25 ppm; sin embargo, aunque se considera a estos peces como eurihalinos, el esperma sólo es viable en agua salada (agua de mar 34 ppm) (Seaman y Collins, 1983) y esta salinidad es indispensable para el desarrollo normal de los huevos y larvas (Muhlía-Melo *et al.*, 1995).

DIAGNOSIS

Figura 2.

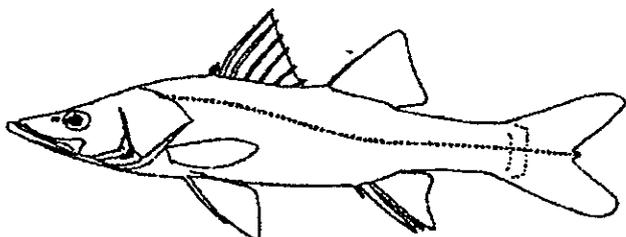


Figura 3.

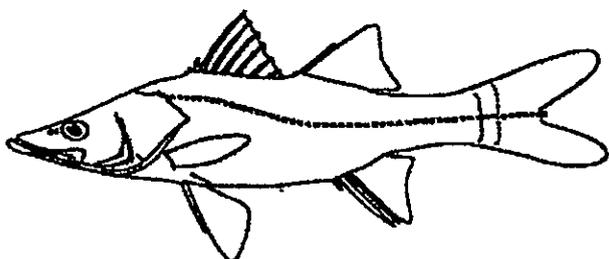
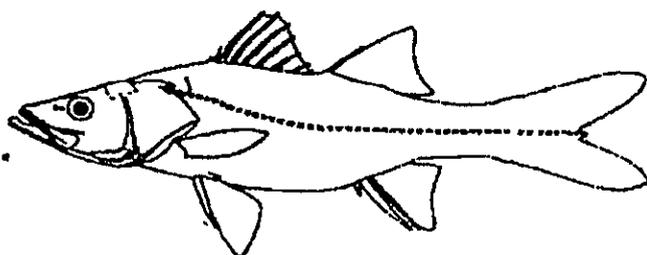


Figura 4.



C. undecimalis

- Escamas pequeñas, de 67 a 78 en una serie longitudinal.
- Segunda aleta dorsal con una espina y generalmente 10 radios.
- Tercera espina dorsal más larga que la cuarta.
- Aleta anal con tres espinas y de cinco a siete radios.
- Segunda espina anal lejos de alcanzar la base de la caudal.
- Línea lateral oscura.
- Golfo de México.

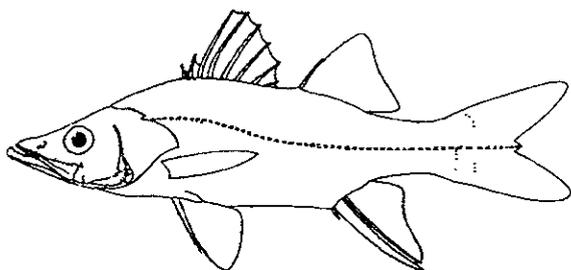
C. viridis

- Escamas de la línea lateral generalmente de 69 a 73.
- Segunda aleta dorsal con una espina y nueve radios.
- Tercera espina dorsal "mucho" más alta que la cuarta
- Aleta anal con tres espinas y seis radios
- Segunda espina anal lejos de alcanzar la base de la caudal
- Línea lateral oscura
- Pacífico

C. nigrescens

- Escamas de la línea lateral generalmente de 71 a 74.
- Segunda aleta dorsal con una espina y diez radios.
- Tercera espina dorsal de igual altura o más pequeña que la cuarta.
- Aleta anal con tres espinas y seis radios
- Segunda espina anal lejos de alcanzar la base de la caudal
- Línea lateral oscura
- Pacífico

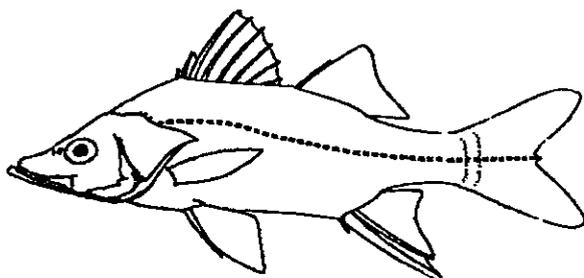
Figura 5.



C. mexicanus

- Escamas de la línea lateral generalmente de 65 a 81.
- Segunda aleta dorsal con una espina y diez radios.
- Tercera espina dorsal más grande que la cuarta.
- Aleta anal con tres espinas y seis radios
- Segunda espina anal llega a alcanzar la base de la caudal
- Línea lateral clara.
- Golfo de México

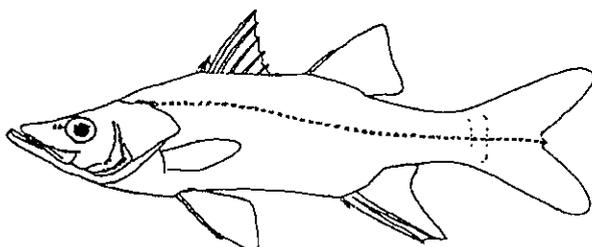
Figura 6.



C. robalito

- Escamas de la línea lateral generalmente de 49 a 54.
- Segunda aleta dorsal con una espina y diez radios.
- Tercera espina dorsal de igual altura que la cuarta.
- Aleta anal con tres espinas y seis radios
- Segunda espina anal llega a alcanzar la base de la caudal
- Línea lateral clara
- Pacífico

Figura 7.



C. medius

- Escamas de la línea lateral generalmente de 55 a 62.
- Segunda aleta dorsal con una espina y diez radios.
- Aleta anal con tres espinas y siete radios
- Segunda espina anal casi alcanza la base de la caudal
- Línea lateral oscura; aletas pélvicas generalmente negras en su tercio distal.
- Pacífico

separar mezclas de proteínas basándose en sus propiedades físico-químicas mediante la aplicación de una corriente eléctrica.

Las proteínas están compuestas por aminoácidos unidos entre sí formando cadenas polipeptídicas, secuencia que representa la estructura primaria. Cada uno de estos aminoácidos posee una estructura caracterizada por la presencia de un grupo amino (NH_2) y de un grupo carboxilo (COOH) que le dan a las proteínas un carácter anfotérico, es decir, el de comportarse como ácidos o bases con carga neta positiva, negativa o neutra. Dicha carga se ve influenciada por el pH del medio en que se encuentra la proteína, si ésta se encuentra en un pH alcalino en relación a su punto isoeléctrico (pH en el que la cantidad de grupos NH_3^+ y COO^- son equivalentes) poseerá entonces una carga neta negativa (se comportará como anión). Por el contrario, cuanto más se aleje el pH de su punto isoeléctrico a la zona ácida del mismo, la proteína tendrá una carga neta positiva y actuará como catión (Nuño, 1978; Pasteur *et al*, 1988; Richardson, 1986; Utter *et al.*, 1987). Dado que la separación de las proteínas se lleva a cabo en una matriz de gel, la carga, la forma y el tamaño de las proteínas influyen en su movilidad.

Hay cuatro principales medios de soporte que se utilizan actualmente en electroforesis: almidón, poliacrilamida, agarosa y acetato de celulosa. La matriz de soporte se elige de acuerdo a los objetivos y el grado de resolución que se desee. A pesar de que los geles de almidón son los de menor poder de resolución en relación con los mencionados, son de los más utilizados en estudios de sistemática y genética de poblaciones debido a su costo relativamente bajo, a su versatilidad y facilidad de uso dado principalmente por que del gel se pueden obtener hasta 6 porciones que permiten estudiar seis enzimas distintas de manera simultánea, con lo cual el número de datos generados por un solo corrimiento es mayor que en los casos de los otros geles mencionados.

Los datos que pueden obtenerse por la aplicación de éste método son las isoenzimas, que son todas las formas moleculares diferentes que catalizan la misma reacción; a su vez, las aloenzimas corresponden a la expresión de varias formas alélicas que resultan de la expresión de una isoenzima en particular separadas por electroforesis en un gel (Murphy *et al*, 1996; Utter, *et al*, 1987).

La electroforesis ha sido aplicada ampliamente en diferentes organismos (animales, plantas, bacterias, protozoarios), usándose en la medicina para el diagnóstico de algunas enfermedades, en estudios de estructura poblacional, en sistemática, en la identificación genética, en estudios de paternidad, de hibridación, de niveles de poliploidía, de tasas de evolución, reconstrucción filogenética, etc. (Murphy *et al*, 1996 y Richardson *et al*, 1986)

La diferenciación genética entre las especies y sus probables relaciones filogenéticas, pueden ser inferidas a partir del grado de diferenciación en la estructura primaria de las proteínas (Dobzhansky *et al.*, 1993). Las secuencias de aminoácidos en las proteínas reflejan directamente las secuencias de nucleótidos en los genes que las codifican, por lo que la electroforesis es una herramienta eficiente para detectar la variación en dicha secuencia entre individuos de una muestra de una población, y puede ser utilizada para estimar los niveles de variabilidad genética existente en las poblaciones naturales, siendo útiles como caracteres taxonómicos para investigar relaciones evolutivas de un grupo de especies (Richardson *et al.*, 1986).

- **Codificación de caracteres y obtención de dendogramas.**

A pesar de que la electroforesis ha sido una técnica muy utilizada, no hay un consenso en cuanto a la adopción del algoritmo más apropiado para el tratamiento del polimorfismo observado y por ello el procesamiento de los datos para inferir la filogenia es complicado (Goyenechea, 2000; Llorente y Vega, 1994).

En estudios filogenéticos, se han utilizado diferentes algoritmos y distintas maneras de codificar los caracteres obtenidos de la electroforesis. En términos generales, a partir de los datos se obtienen las frecuencias génicas que pueden transformarse en medidas de distancia genética (como por ejemplo la distancia de Nei, 1972) para poder realizar un análisis de agrupamiento y construir dendogramas (fenogramas en este caso). Los caracteres enzimáticos también pueden tratarse de una manera cladista clásica bajo el criterio de posición filogenética por medio del método del grupo externo (Llorente y Vega, 1994), según los principios de Hennig (1966), establecidos para caracteres morfológicos pero que han sido algunas veces adoptados para caracteres electroforéticos (Richardson, *et al.* 1986).

Diversos autores han descrito varios métodos de tratamiento de los datos electroforéticos. En primera instancia, con base en las frecuencias alélicas detectadas en el grupo se pueden obtener datos de distancia genética (Buth, 1984). De modo alterno, los autores consideran a las lecturas de las enzimas como datos de "carácter / estado". En este tipo de tratamiento de los datos se deben resolver varios puntos, entre ellos: a) la codificación y el ordenamiento de los caracteres, b) el método de agrupamiento, y c) el enraizamiento del árbol. En cuanto a la codificación, que en principio es más complicada que en los métodos de distancia, el problema consiste en establecer el carácter y el estado del carácter. Algunos de los métodos que se proponen para esto son: tomar a los alelos individuales como caracteres separados considerando su presencia o ausencia como los estados del carácter (Buth, 1984;

Mabee y Humphries, 1993; Rohlf y Wooten, 1988), en este caso se obtienen las frecuencias alélicas y debido a que los alelos son caracteres con dos posibles estados, se considera como "presente" si su frecuencia es mayor de 0.05 y "ausente" si su frecuencia es menor de 0.05. (Buth, 1984). Otros autores sugieren tomar al locus como un carácter multiestado (Mabee y Humphries, 1993; Dowling y Brown, 1989), mientras que algunos prefieren codificar el polimorfismo como el estado del carácter plesiomórfico, o codificar el polimorfismo como tal (Kornet y Turner, 1999). Sobre los métodos de agrupamiento más apropiados para la obtención de los dendogramas y que los autores aplican con mayor frecuencia se encuentran el de parsimonia de Wagner, de Máxima verosimilitud, UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages), y Neighbor-joining (Buth 1984; Rohlf y Wooten, 1988; Dowling y Brown, 1989; Shaffer *et al*, 1991; Wiens y Servedio, 1998). En lo referente al enraizamiento del árbol el método más utilizado es el del grupo externo.

- **Inferencia Filogenética**

En el intento de establecer las relaciones de filogenia entre los organismos han surgido tres escuelas principales, la escuela evolucionista que basa las relaciones en procesos evolutivos y adaptativos; la escuela fenética que define las relaciones entre los organismos por la semejanza fenotípica de todos sus caracteres (de esta corriente surgieron los métodos de distancia), y los cladistas que, siguiendo las ideas de Hennig (1966), definen las relaciones filogenéticas mediante la magnitud en que son compartidos los caracteres derivados (caracteres apomórficos, que son heredados por dos o más taxa a través del mismo ancestro) por lo que argumentan que la clasificación debe basarse en el reconocimiento de sus relaciones genealógicas (ancestría común) (Eguiarte *et al.*, 1997; Villaseñor y Dávila, 1992; Morrone, 2001; Wiley, 1981; Wiley *et al.*, 1991)

Los algoritmos de los feneticistas que se han utilizado con el propósito de encontrar las relaciones entre los organismos no concuerdan con las ideas de los cladistas; los métodos que se utilizan más comúnmente son el UPGMA y el Neighbor-Joining considerados como métodos de distancia. El fundamento de estos análisis es que los organismos más parecidos deben ser los más emparentados. De manera general, estos métodos calculan un índice de distancia entre pares de taxa tomando en cuenta los caracteres que comparten; es decir, reducen todos los caracteres analizados a un solo número (de distancia evolutiva) entre un par de taxa (Eguiarte *et al.*, 1997). El UPGMA o "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages" fue uno de los primeros métodos cuantitativos utilizados en la reconstrucción

Los grupos monofiléticos se definen por los estados del carácter considerados como novedades evolutivas, que consisten en cambios en el estado de los caracteres respecto de aquellos previamente establecidos o fijos en un grupo de organismos. De esta manera, si se compara un carácter con dos estados alternativos, uno de ellos puede ser considerado como primitivo o *plesiomórfico* y la novedad como el estado derivado o *apomórfico*. La ordenación de los estados del carácter es importante para determinar la polaridad de los caracteres (la definición de cuál estado representa la condición plesiomórfica y cuál la apomórfica). El método más utilizado para conocer esta polaridad es la utilización de un grupo externo en el que se buscan las homologías con el grupo estudiado; el grupo externo elegido generalmente será un grupo hermano lo más cercano posible en términos evolutivos. Si, al hacer las comparaciones de los estados del carácter en ambos grupos, éste se presenta tanto en el grupo externo como en el interno (grupo en estudio) entonces es considerado como plesiomórfico (ancestral) para el grupo interno. Si, por el contrario, el estado se encuentra ausente en el grupo externo y únicamente está representado en el grupo bajo estudio, entonces el estado es considerado como apomórfico (derivado) para el grupo interno (Eguiarte *et al.*, 1997; Villaseñor, 1992).

Los algoritmos utilizados en la reconstrucción filogenética y que son afines con las ideas expuestas con anterioridad, se agrupan dentro de 2 enfoques principales: algoritmos de *compatibilidad* (como "CLIQUE") y algoritmos de simplicidad o *parsimonia* (Wiley, 1981). Los métodos de compatibilidad tratan de identificar el árbol que es apoyado por el mayor número de caracteres, pero este método hasta el momento no ha sido muy utilizado ya que en repetidas ocasiones genera resultados poco satisfactorios (Eguiarte *et al.*, 1997), además de la lentitud con la que es posible obtener los resultados. Por su parte, la simplicidad de caracteres o *parsimonia* analiza todos los posibles árboles derivados del análisis de los taxa, y evalúa el número de cambios que se requieren para generar cada uno; así, el árbol que represente el menor número de cambios (pasos) o eventos evolutivos, refleja de mejor manera la filogenia del grupo. Hay distintas versiones del análisis de *parsimonia*: la llamada *parsimonia* de Wagner, la de Dollo y la de Camin-Sokal.

Cuando se lleva a cabo el análisis de *parsimonia*, el número de árboles posibles es muy grande, por lo que el proceso resulta muy lento; debido a esto, hasta el momento se han propuesto algunos métodos de búsqueda para encontrar el árbol más corto en un menor tiempo, tal es el caso de los métodos exactos y heurísticos. Este último método no siempre asegura encontrar el cladograma más corto, sobre todo cuando se analizan muchos taxa, y el algoritmo más común es el llamado "Branch-Swapping". Los métodos exactos garantizan

encontrar el árbol más corto; el algoritmo más utilizado es el "Branch and Bound", el cual pretende encontrar el cladograma más corto sin tener que generar todos los árboles posibles (Eguiarte *et al.*, 1997; Villaseñor, 1992; Wiley, 1991).

En todos los algoritmos mencionados antes e independientemente de la escuela de clasificación que se siga, es posible saber qué tan eficiente resulta el método de reconstrucción filogenética aplicado en los taxa estudiados, lo que se logra por medio de una evaluación del soporte estadístico de los grupos monofiléticos encontrados en los árboles construidos. Con este propósito, a partir de la segunda mitad de los 80's en la mayoría de los trabajos revisados se utilizaron métodos de remuestreo como el "bootstrap" (introducido para estimaciones filogenéticas por Felsenstein, 1985), el cual involucra la generación de remuestreos con reemplazo a partir de la matriz de datos original para crear nuevos grupos de datos, con el fin de evaluar el efecto en el incremento del tamaño de la muestra mediante la generación de un intervalo de confianza que permite evaluar la cantidad de sesgo atribuible al azar con el propósito de estimar la confiabilidad de la filogenia.

- **Sistemática del género**

Hasta la mitad de la década de los 80's se reconocían 9 especies de Centropómidos en las aguas tropicales y subtropicales del continente Americano, 5 de las cuales se encuentran en el océano Atlántico: *C. ensiferus*, *C. pectinatus*, *C. parallelus*, *C. undecimalis* y *C. poeyi*; mientras que en el Pacífico se reportaba la distribución de: *C. nigrescens*, *C. robalito*, *C. armatus*, *C. unionensis*, *C. undecimalis* y *C. pectinatus* (Chávez 1961 y 1963; Greenwood, 1976; FAO, 1978; Castro, 1978). En general, se consideraba que *C. undecimalis* y *C. pectinatus* estaban presentes en ambos océanos. La distribución de *C. ensiferus* en México es incierta para la mayoría de los autores, aunque Jiménez (1984) indica que es relativamente abundante en el país.

En un trabajo más reciente realizado por Rivas (1986) el número de especies reportadas aumenta a 12, seis especies para cada uno de los litorales, y no se informa de la presencia de ninguna de ellas en ambos océanos. Las especies encontradas en el Atlántico son: *C. undecimalis*, *C. poeyi*, *C. parallelus*, *C. pectinatus*, *C. ensiferus* y *C. mexicanus*. En el Pacífico: *C. viridis*, *C. nigrescens*, *C. medius*, *C. robalito*, *C. armatus*, y *C. unionensis*

A las conclusiones de Rivas, se han sumado recientemente los trabajos de Muhli-Melo *et al.* (1995); la guía FAO (1995); y los de Tringali *et al.* (1999a y 1999b), quienes han reconocido las mismas 12 especies como integrantes del género.

De los anteriores reportes, resalta el realizado por Tringali *et al* (1999b), quienes, como se verá más adelante, con base en isoenzimas y la secuencia del gen 16S del rRNA realizaron la reconstrucción de la filogenia, confirmando la presencia de las doce especies y la filogenia reportada por Rivas (1986).

La mayoría de las especies de robalo se distribuyen en gran parte de los litorales del territorio nacional, con excepción de *C. unionensis* quien se encuentra sólo en Centroamérica, de El Salvador hasta Perú (Rivas, 1986). En los distintos artículos sobre el tema se confirma la ubicación de *C. ensiferus* (que se distribuye de Veracruz, Mex., y Florida hasta Brasil) y *C. armatus* (la cual se encuentra de Mazatlán, Mex. a Ecuador) en México, pero mencionan que su presencia es muy rara en el país. Por su parte, el robalo prieto, *C. poeyi*, es el más restringido de todo el género y siendo endémico del Golfo de México se encuentra únicamente en los estados de Campeche, Tabasco, Veracruz y Tamaulipas (Chávez, 1963; Rivas, 1986; FAO, 1995; Muhlia-Melo *et al.*, 1995; Fuentes, 1973).

La dificultad para distinguir las diferentes especies de robalo es debida a su gran similitud morfológica y a que muchos de los caracteres que son utilizados en la diagnosis de las especies en ocasiones se sobreponen o cambian de acuerdo a la edad del organismo, dificultando el conocimiento de su taxonomía y de su distribución, así como de su filogenia y evolución. En taxonomía las fuentes tradicionales de información han sido los caracteres morfológicos; en un buen número de casos las investigaciones morfológicas permiten aportar información acerca del grupo de manera confiable, no obstante, con frecuencia existe incertidumbre por la presencia de homoplasias en algunos caracteres, o por la carencia de suficientes caracteres morfológicos útiles desde el punto de vista de estudios de su filogenia, lo que hace difícil distinguir y/o definir a las especies que conforman a un grupo y establecer sus relaciones de genealogía. Debido a esto, frecuentemente es necesario recurrir a otro tipo de caracteres que permitan reexaminar los planteamientos realizados mediante los métodos llamados tradicionales para confrontar, complementar o ampliar dicha información. Por lo anterior, a la fecha los estudios en sistemática molecular son importantes en diversos grupos taxonómicos, en ciertos casos han sido muy útiles en la identificación de especies y han aportado información confiable para producir hipótesis genealógicas (Dobzhansky *et al.*, 1993; Llorente *et al.*, 1994, Hillis *et al.*, 1996).

Hay que tener en consideración que tanto los estudios de morfología como los de biología molecular tienen ventajas y desventajas. Hillis (1987) menciona que mientras que los datos morfológicos pueden depender de las influencias ambientales para su expresión, los

moleculares no están sujetos a la influencia ambiental por lo que tienen mayores posibilidades de aplicación, además de que en ocasiones proveen un mayor número de datos comparados con los de morfología. Sin embargo las investigaciones de morfología además de que resultan más económicas, cuentan con muestras disponibles de las colecciones en museos y pueden utilizar la evidencia fósil, mientras que sólo en algunas ocasiones los estudios moleculares pueden hacer uso de los mismos.

Awise (1975) señala algunas ventajas y desventajas de los caracteres electroforéticos; en general los considera como una buena herramienta en sistemática. A nivel de subespecies y a nivel genérico la técnica de electroforesis no es del todo adecuada. En cambio, las grandes diferencias bioquímicas entre especies, hacen de la electroforesis una técnica de gran valor para identificaciones específicas o de grupos de especies. Las especies hermanas, casi indistinguibles dada la similitud morfológica, pueden ser identificadas mediante estudios electroforéticos. Por último, menciona que en muchos casos la sistemática clásica (basada en los caracteres morfológicos) es de gran precisión, y en algunos otros la electroforesis tiene mayor poder de discernimiento. Este autor en 1994, señala su utilidad en estimaciones del flujo génico, o comparaciones entre poblaciones, especies u otros taxa una vez obtenidas las distancias genéticas; la señala también como una herramienta informativa como marcador filogenético.

Shaklee *et al* (1982) mencionan que la electroforesis de isoenzimas es una buena opción para distinguir especies morfológicamente similares; las interacciones entre las mismas pueden ser investigadas usando valores de distancia genética derivada de las similitudes y diferencias proteínicas; pueden construirse claves bioquímicas; y es apropiada para estudios de sistemática en peces, ya que generalmente tienen niveles relativamente bajos de polimorfismo y heterocigocidad.

Hay que tener en cuenta que algunos caracteres bioquímicos son de gran valor para el estudio de algunos grupos en determinados niveles de la jerarquía taxonómica. En otros grupos o niveles de esta jerarquía, los caracteres morfológicos continúan siendo valiosos, tanto como los bioquímicos (Llorente y Vega; 1994).

El análisis de ADN paulatinamente se ha convertido en una herramienta importante en ecología evolutiva, genética de poblaciones y sistemática, aunque los costos en cuanto infraestructura e insumos son elevados. No obstante el análisis de isoenzimas sigue siendo usado ampliamente por su eficacia, ya que las proteínas permanecen como componentes estructurales y enzimáticos de las células, y el costo de la técnica es relativamente bajo (Pérez y Piñero, 1997).

Basados en los argumentos anteriores, en el presente trabajo, se utilizó la electroforesis de isoenzimas sobre otras técnicas, ya que es un método adecuado en la identificación interespecífica de los organismos dando resultados confiables a este nivel, además de que no es muy complicado ni excesivamente caro.

Avise (1975 y 1994) y Shaklee, *et al* (1982), apuntaron la posibilidad de elaborar claves de identificación genética con el empleo de caracteres electroforéticos. Tringali *et al* (1999a) elaboraron una clave de identificación genética del género *Centropomus* (con las doce especies) utilizando isoenzimas y secuencias del gen 16S del rRNA. La similitud morfológica presente en estas especies trae consigo la imposibilidad de distinguir las diferentes especies explotadas en las pesquerías, por lo que no se tiene conocimiento sobre cuánto de cada especie se explota. En el presente trabajo se trató de proporcionar una herramienta precisa y sencilla como lo es la electroforesis de isoenzimas para la identificación de las especies y con la que posteriormente se podrán hacer estimaciones de la incidencia y proporción de cada especie en las capturas aportando datos objetivos para su administración.

Existen pocas investigaciones acerca de la filogenia del género *Centropomus*, entre las que destaca la de Rivas (1986) que con base en las similitudes y diferencias de caracteres morfológicos estableció una posible filogenia de las especies y subdividió el género en tres grupos, cada uno de los cuales representa líneas filéticas distintas (ver figura 8):

- a) *C. pectinatus*, y *C. medius*
- b) *C. undecimalis*, *C. nigrescens*, *C. viridis*, *C. poeyi*, *C. parallelus*, y *C. mexicanus*.
- c) *C. ensiferus*, *C. unionensis*, *C. armatus*, y *C. robalito*.

La investigación más reciente sobre relaciones filogenéticas de Centropomidos fue realizada por Tringali *et al* (1999b), quienes examinaron las doce especies del género *Centropomus* utilizando electroforesis de isoenzimas (figura 9a) y análisis de la secuencia de la región 16S del rRNA del ADN mitocondrial (figura 9b). Para el análisis de los caracteres enzimáticos emplearon los métodos de parsimonia, el Neighbor-Joining y UPGMA. Las relaciones filogenéticas entre las especies basadas en la secuencia del rRNA se examinaron aplicando análisis de parsimonia, de mínima evolución y de Maximum likelihood. Los resultados de ambos tipos de caracteres indicaron que el género *Centropomus* está subdividido en cuatro grupos de especies. Los autores proponen que la hipótesis basada en la filogenia obtenida del gen 16S rRNA resulta más confiable debido principalmente a que presentó los valores mayores de confiabilidad de las ramas obtenidos mediante bootstrap (ver figura 9b).

Es importante mencionar que en el análisis de isoenzimas de esa publicación aunque el número de loci estuvo bien representado, con 19 enzimas (27 loci), el tamaño de muestra de los organismos investigados fue pequeña, teniendo un promedio de cinco individuos por especie, con excepción de *C. undecimalis* cuya muestra consistió de 259;. Por lo anterior, en el presente estudio se consideró importante aumentar el tamaño de la muestra de las especies analizadas, con el objeto de incrementar la confiabilidad del uso de los caracteres electroforéticos en la identificación de diferencias ínterespecíficas para utilizarlas como una aproximación alterna en la reconstrucción filogenética del grupo. Adicionalmente, los alelos específicos de cada especie podrán servir como marcadores con los que sea posible, a un costo relativamente bajo, identificar a las especies que son capturadas por las pesquerías a fin de poder realizar estudios de la pesquería por especie más apegados a la realidad.

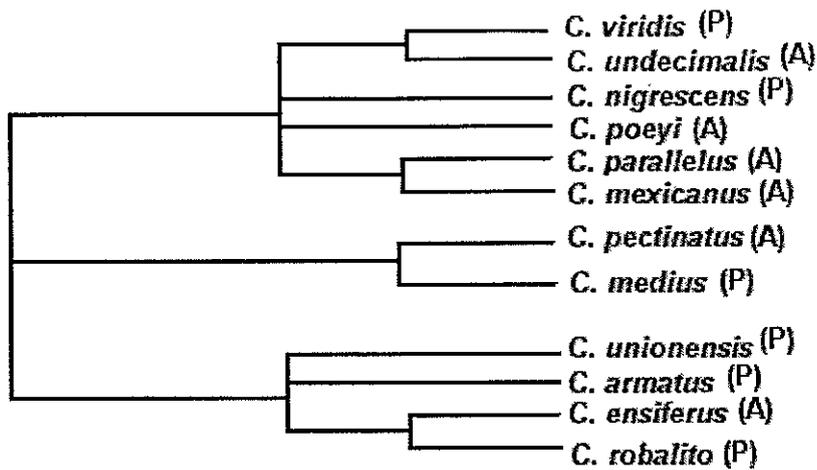


Figura 8. Hipótesis filogenética propuesta por Rivas (1986) basada en caracteres de morfología.

P= Especies que habitan en el Pacífico. A= Especies del Atlántico.

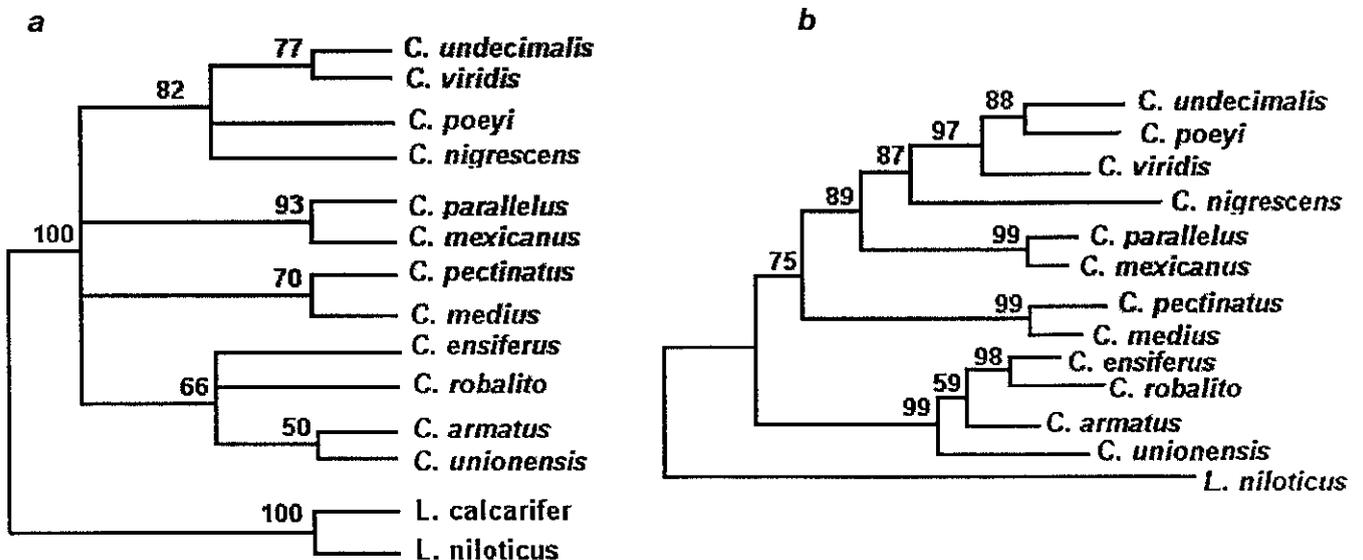


Figura 9. Hipótesis filogenética propuesta por Tringali *et al.*; 1999: a) mediante el método de parsimonia para datos electroforéticos. b) mediante el método de mínima evolución basado en los datos del gen 16S del rRNA. Los números de los nodos son los valores de bootstrap.

Objetivo general

- Establecer una hipótesis sobre las relaciones de parentesco de 6 especies del género *Centropomus* con base en caracteres isoenzimáticos con un tamaño mayor de muestra que en estudios previos, y con el fin de determinar de manera precisa a los ejemplares capturados o tejidos pertenecientes a estas especies, lo que en un futuro podrá contribuir en un manejo más adecuado de la pesquería mediante la obtención de estimaciones de captura por especie.

Objetivos particulares

- Obtener los patrones electroforéticos de aquellas isoenzimas que permitan el diagnóstico interespecífico de las seis especies estudiadas.
- Proponer una clave de identificación genética con base en estos caracteres.
- Comparar los resultados de las relaciones de parentesco obtenidas, con estudios previos basados tanto en caracteres morfológicos (Rivas, 1986), como con los resultados basados en isoenzimas y análisis de secuencias (Tringali, 1999b).

1. Colecta de Organismos.

Se colectaron individuos de seis especies; cuatro de ellas, pertenecientes al Pacífico, obtenidas en los litorales de los estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, Michoacán y Guerrero; y las dos restantes colectadas en el estado de Veracruz, como se muestra en la tabla 1.

Los ejemplares principalmente fueron adquiridos en los mercados de las distintas localidades, mientras que otros, como es el caso de los robalos del Yugo, Sinaloa, se obtuvieron en el estero mediante una captura con chinchorro y con el apoyo de personal del Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C. (CIAD). Otro lote de muestras de tejido fueron donadas por el Laboratorio de Genética de este centro.

A cada robalo se le extrajo una muestra de músculo que fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido ($\approx -180^{\circ}\text{C}$). El espécimen se rotuló y fijó en alcohol al 70%. Tanto las muestras de tejido como los peces fueron transportados al Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología para su posterior análisis. La identificación de las especies se hizo mediante las claves de identificación de Rivas (1986), las claves de la FAO (1978) para las especies del Golfo y de la FAO (1995) para las del Pacífico, y en ocasiones con el apoyo del Laboratorio de Ictiología del Instituto de Biología de la UNAM.

Se utilizó como grupo externo especímenes del género *Epinephelus* conocidos como meros, pertenecientes a la Familia Serranidae. Se hizo esta elección debido a la cercanía genealógica que hay entre ambas familias (Greenwood, 1976). Se obtuvieron 21 de estos organismos en el mercado de La Nueva Viga del Distrito Federal.

2. Electroforesis de isoenzimas.

El número de robalos (*Centropomus spp.*) colectados fue de 246 mientras que el de meros (*Epinephelus spp.*) fue de 21, sumando un total de 267 muestras, que se organizaron en nueve lotes para los corrimientos electroforéticos.

Desde el momento de la obtención de las muestras se mantuvieron congeladas para conservar la actividad enzimática de las proteínas, para ello se almacenaron en un ultra

congelador, a -80° C, y todos los procedimientos posteriores que implicaron la utilización de las mismas (homogenización, extractos, corrimientos, etc.) fueron hechos en frío.

Tabla 1. Localidades, fechas de colecta y número de individuos muestreados de las diferentes especies de robalo (*Centropomus spp.*) analizadas.

ESPECIE	No. DE ORG. COLEC.	LOCALIDAD	FECHA COLECTA	TOTAL DE ORG.
<i>C. viridis</i> (Robalo, Garabato)	5	CIAD	6 / MAR / 98	44
	18	Villa Unión, Sin.	3 / MAR / 98	
	6	El Yugo, Sin.	4 / MAR / 98	
	2	Embarcadero, Sin.	7 / MAY / 99	
	5	Lag. de 3 Palos, Gue.	3 / OCT / 98	
	2	El Chirimoyo, Nay.	8 / MAY / 99	
6	San Blas, Nay.	16 / JUN / 99		
<i>C. robalito</i> (Constantino, pijolín)	25	CIAD	6 / MAR / 98	60
	20	Villa Unión, Sin.	3 / MAR / 98	
	15	Tuxpan, Nay.	8 / MAY / 99	
<i>C. nigrescens</i> (Robalo, Robalo prieto, piedra)	3	CIAD	6 / MAR / 98	41
	25	Lag. 3 Palos, Gue.	3 / OCT / 98	
	1	El Chirimoyo, Nay.	8 / MAY / 99	
	4	El Chupadero, Col.	17 / JUN / 99	
	1	Nexpa, Mich.	18 / JUN / 99	
7	Laz. Cardenas, Mich.	19 / JUN / 99		
<i>C. medius</i> (Robalo, paleta)	10	CIAD	6 / MAR / 98	24
	1	El Chirimoyo, Nay.	8 / MAY / 99	
	3	San Blas, Nay.	16 / JUN / 99	
	2	Laz. Cardenas, Mich.	19 / JUN / 99	
	6	Acapulco, Gue.	20 / JUN / 99	
	2	Zihuatanejo, Gue.	19 / JUN / 99	
<i>C. undecimalis</i> (Robalo blanco)	9	Alvarado, Ver.	6 / MAY / 98	36
	1	La Mancha, Ver.	8 / MAY / 98	
	26	Veracruz, Ver.	8, 9, 11 / ABR / 00	
<i>C. mexicanus</i> (Chucumite)	6	Sontecomapan, Ver.	7 / MAY / 98	41
	1	La Mancha, Ver.	8 / MAY / 98	
	24	Veracruz, Ver.	6, 9 / ABR / 00	
	10	Alvarado, Ver.	9 / ABR / 00	

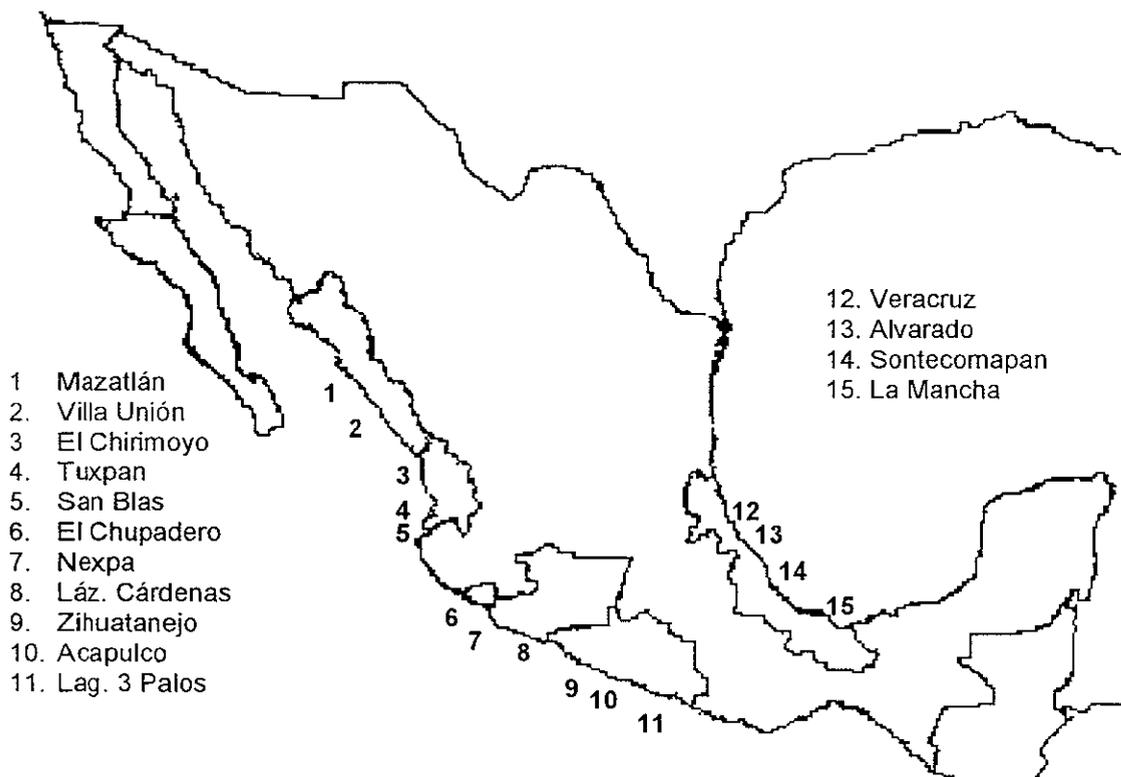


Figura 10. Localidades de colecta de las seis especies de Centropómidos analizadas

- **Extractos:**

Las muestras de tejido fueron maceradas manualmente, con el fin de liberar las proteínas de las células, en una solución de extracción consistente de 0.01M de Tris, 0.001M de EDTA, pH 6.8, y 4ml de NADP. Los extractos se usaron en ocasiones inmediatamente o se almacenaron en congelación hasta su posterior utilización.

- **Sistema de Buffers:**

La electroforesis involucra la utilización de un sistema de buffers o solución amortiguadora tanto para la elaboración del gel, como en los electrodos durante el corrimiento.

Los ensayos para los 33 sistemas isoenzimáticos probados fueron realizados utilizando 8 buffers distintos. De las isoenzimas ensayadas únicamente se resolvieron 12 de manera favorable para su análisis. Tanto las soluciones amortiguadoras como el voltaje y tiempo que dieron la mejor resolución de las enzimas ensayadas se presentan en la tabla 2.

sobre ambas orillas del gel. Las condiciones de corrimiento para cada sistema de buffer, son descritas en la tabla 2.

- **Tinción de enzimas.**

La tinción histoquímica de las enzimas se realizó de acuerdo a las técnicas descritas por Selander *et al* (1971) y Harris y Hopkinson (1976).

Una vez concluido el tiempo de corrimiento el gel fué cortado en rebanadas de aproximadamente 1 mm de grosor, cada una de las cuales se colocó en un recipiente de las dimensiones del gel. En cada rebanada se añadió una solución con los reactivos específicos para cada enzima a ensayar. Estas soluciones consisten de un sustrato en el cual reacciona una enzima específica, y de un mecanismo de tinción. La técnica de tinción que se usa más comúnmente identifica reacciones que involucran la transferencia de un ion hidrógeno del sustrato para el NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) o NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) (estas son las reacciones deshidrogenasas). El PMS (Phenazine methosulfate) se usa para transferir el ion H^+ del NAD a una solución de tetrazolium, como el MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) o NBT (Nitro blue tetrazolium), esta sal es reducida a azul de formazan, el cual aparece como una zona púrpura en el gel (Pérez y Piñero, 1997; Hillis, 1987; Richardson *et al.*, 1986). En algunos casos como con las peptidasas, la PGM y la ALD se obtuvo una mejor resolución preparando las soluciones de tinción en agar, esto es, mezclando las cantidades de cada uno de los reactivos del protocolo descrito en una solución de agar al 10%. Posteriormente, cada rebanada de gel fue incubada a 37°C durante 15 min. o hasta lograr obtener una resolución adecuada, procurando evitar el exceso de tinción de tal forma que se pudiera facilitar la obtención de una buena lectura para cada individuo.

Finalmente, con el propósito de detener la tinción y preservar los geles, se utilizó una solución fijadora a base de ácido acético, metanol y agua en proporción 5:5:1. Los geles fueron fotografiados, envueltos en plástico y almacenados.

3. Interpretación

Después de la tinción se registraron los patrones electroforéticos de cada enzima, donde fueron consideradas el número de bandas presentes, así como sus diferencias de movilidad en el gel originadas por la migración diferencial de las proteínas, que corresponden a las diferencias en el tamaño molecular y la carga eléctrica de cada una de ellas. La determinación del número de bandas de cada locus, fue establecido mediante la inclusión de

las distintas especies analizadas en un mismo gel para contar con un criterio de homología de las diferentes bandas. De esta manera se realizaron las comparaciones entre todas las especies para determinar el número de alelos en cada locus. Los estados del carácter de un locus determinado corresponde al valor de frecuencia alélica; en el análisis de parsimonia corresponde a la presencia o ausencia de estas frecuencias de cada una de las diferentes bandas encontradas en cada locus y para todas las especies.

En el caso de aquellos loci que presentaron polimorfismo intraespecífico, la interpretación de los datos se realizó tomando en consideración el número de loci presentes, la estructura de la enzima representada por el número de subunidades polipeptídicas que la conforman, así como el número de bandas que presentó cada locus en cada especie. Estos datos permiten determinar en que casos el individuo es homocigoto y en cuales es heterocigoto. Los individuos homocigotos presentan sólo una banda debido a que tienen la misma subunidad polipeptídica, en cambio los heterocigotos tienen polipéptidos diferentes por lo que en éstos se presentan más de una banda.

La interpretación y nomenclatura de los loci y de los alelos fue la descrita por Shaklee *et al* (1989). Según este método, se utiliza la abreviación de la enzima para denominar el locus representado por esa proteína. En el caso de las enzimas que presentaron dos o más loci se numeraron de acuerdo a su movilidad, iniciando con el locus de mayor migración y el resto en orden sucesivo.

La nomenclatura en el caso de los loci polimórficos se basó en asignar el número 100 al alelo más común (de mayor frecuencia) en todas las especies, y a partir de éste se restó o sumó la distancia de migración en mm nombrando así a los alelos sucesivos.

4. Análisis de datos

Una vez obtenidas las lecturas de los alelos a partir de la interpretación de los geles, se calcularon las frecuencias génicas con ayuda del programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981). De estas frecuencias se procedió a lo siguiente:

A) Se construyó una clave de identificación genética de las seis especies colectadas basada principalmente en las enzimas que presentaron electromorfos exclusivos de las diferentes especies. En especies donde no se detectaron alelos que fueran exclusivos se recurrió a considerar a algún otro electromorfo que nos fuera de utilidad para su identificación. Cuando no se encontró un loci que fuera monomórfico en una especie, se tomó en cuenta a otro locus que presentara un alelo con una frecuencia alta (muy cercana a 1.0).

B) Por otra parte, los datos de frecuencias ordenados en matrices de datos fueron analizados mediante el programa PHYLIP (Phylogeny Inference Package. Felsenstein, 1993). La obtención de los dendogramas se realizó bajo criterios cuantitativos, en base a las distancias genéticas mediante la codificación de las frecuencias; y cualitativos o de parsimonia, codificando los datos de manera discreta como presencia-ausencia de dichas frecuencias. Los procedimientos realizados se presentan a continuación:

- 1) En un análisis inicial, las frecuencias génicas fueron ordenadas en una matriz de datos y analizadas mediante la utilización del programa PHYLIP para la obtención de la filogenia con base en el método de "maximum-likelihood" o máxima verosimilitud. Posteriormente, se realizó un bootstrap con 1000 remuestreos sobre la matriz de frecuencias, a partir de los cuales se aplicó éste análisis de máxima verosimilitud y posteriormente se obtuvo un árbol consenso para mostrar los valores de ocurrencia de los agrupamientos formados.
- 2) Las frecuencias genéticas fueron analizadas también para la obtención de dendogramas mediante la utilización del método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) de la manera siguiente: se utilizó un remuestreo mediante "bootstrap" utilizando 1000 réplicas sobre las frecuencias génicas, a partir de los cuales se obtuvieron las distancias genéticas de Nei (Nei, 1972) que posteriormente se usaron para construir un número equivalente de dendogramas con base en el agrupamiento por Neighbor-Joining. Finalmente, fue obtenido un consenso de mayoría para construir la filogenia mostrando todos los grupos monofiléticos inferidos que ocurrieron en la mayoría de muestras obtenidas por bootstrap (Felsenstein, 1985).
- 3) Un tercer análisis consistió en transformar la información en caracteres discretos, tomando a los alelos como carácter (Buth, 1984) y como los estados del carácter, la presencia (si la frecuencia génica para ese alelo es mayor de 0.05) o ausencia (si la frecuencia es menor de 0.05) de los mismos, asignando el número 0 al carácter plesiomórfico o ancestral y el número 1 al carácter apomórfico o derivado según el método del grupo externo (el 0 generalmente corresponde al carácter ancestral presente en el grupo externo, *Epinephelus*). Utilizando estos caracteres (tabla 9 y 10) se realizó nuevamente un remuestreo por "bootstrap" utilizando 100 réplicas; sobre estos datos se utilizó el criterio de parsimonia de Wagner para obtener el árbol más parsimonioso por el algoritmo exacto de "Branch-and-bound" (Hendy y Penny, 1982).

RESULTADOS

El análisis electroforético resultó en la obtención de 14 enzimas con resolución adecuada generando 17 loci génicos, sin embargo sólo se utilizaron para el análisis aquellas que se separaron adecuadamente, y que presentaron polimorfismo informativo. De acuerdo con la tabla 3, de los 17 loci resueltos 4 fueron monomórficos interespecificamente (*Icd*, *Got*, *Est*, *Gapdh*) ya que en todas las especies de *Centropomus* y en *Epinephelus* se presentó la misma banda; mientras que 13 loci presentaron polimorfismo dentro (intraespecífico) o entre (interespecífico) especies, aunque en dos de ellos (*Pap* y α -*Gpd*) no hubo una resolución suficiente.

Tabla 3. Isoenzimas analizadas en 6 especies de robalos (*Centropomus spp.*).

	ABREVIACIÓN Y NOMBRE DE LA ENZIMA	No. E.C.	No. LOCI	ESTRUCTURA PROTEÍNA.	P/M
FH	Fumarasa	1.2.1.2	1	Dimérica	P
LDH	Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	1	Tetramérica	P
	Peptidasas:				
LA	Leucil-L- alanina (PEP-A)	3.4.11.1	2	Monomérica	P
LGG	L-Leucil-glicil-glicina (PEP-B)	3.4.11.4	2	Monomérica	P
PAP*	L-leucil-L-prolina (PEP-D)	3.4.11.5	1	No determinada	P
GPI	Glucosa Fosfato Isomerasa	5.3.1.9	2	GPI-1 Dimérica GPI-2 Monomérica	P P
6 PGD	Fosfogluconato deshidrogenasa	1.1.1.44	1	Dimérica	P
ICD	Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	1	Dimérica	M
PGM	Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	1	Monomérica	P
ALD	Aldolasa	4.1.2.13	1	No determinada	P
α GPD*	Alfa-Glicerofosfato deshidrogenasa	1.1.1.8	1	Dimérica	P
EST	Esterasa	3.1.1.1	1	Monomérica	M
GOT	Glutamato oxalato transaminasa	2.6.1.1	1	No determinada	M
GAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12	1	No determinada	M

La nomenclatura y numeración de las enzimas sigue las normas establecidas por la "International Union of Biochemistry" y la "Enzyme Commission" (E.C.), 1989. Los buffers se prepararon de acuerdo a Selander *et al* (1971) y Harris y Hopkinson (1976). P = Enzima Polimorfica; M = Enzima monomórfica. *Enzimas que presentaron polimorfismo pero insuficiente resolución que permitiera una interpretación confiable.

TABLE 4. Frecuencias alélicas de los loci polimórficos en 6 especies del género *Centropomus* spp y de *Epinephelus* sp.

Locus	No.C.	Alelo	CV	CR	CN	CM	CU	CX	EPI
<i>La-1*</i>	1	92	.000	.000	.987	.000	.000	.000	1.000
	2	97	.000	.000	.000	1.000	.944	.000	.000
	3	100	1.000	1.000	.013	.000	.056	1.000	.000
		n	46	61	39	24	36	41	21
<i>La-2*</i>	4	90	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000
	5	100	.000	.000	.000	1.000	.803	.866	1.000
	6	105	1.000	.000	.000	.000	.197	.134	.000
	7	110	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	.000
	n	46	61	39	21	33	41	21	
<i>Lgg-1*</i>	8	92	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	9	96	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000
	10	100	1.000	1.000	.000	.000	1.000	1.000	.000
	11	104	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	.000
	n	46	61	39	24	36	41	21	
<i>Lgg-2*</i>	12	90	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000
	13	100	.000	.000	.000	1.000	.833	1.000	.000
	14	103	1.000	1.000	.000	.000	.167	.000	.000
	15	106	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	n	46	61	39	22	33	39	1	
<i>Fh</i>	16	100	.978	.000	1.000	.000	1.000	.000	.000
	17	103	.022	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	18	105	.000	.000	.000	1.000	.000	.415	.000
	19	110	.000	1.000	.000	.000	.000	.585	.000
	n	46	61	39	24	36	41	20	
<i>Gpi-1*</i>	20	88	.000	.025	.000	.000	.000	.000	.000
	21	92	.000	.000	.000	.000	.014	.000	.000
	22	94	.022	.000	.000	.000	.139	.000	.000
	23	97	.000	.433	.000	.000	.000	.000	.000
	24	100	.978	.000	1.000	.000	.847	.000	.000
	25	102	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	26	104	.000	.542	.000	1.000	.000	1.000	.000
	n	46	60	39	24	36	41	21	
<i>Gpi-2*</i>	27	95	.587	.458	.026	.000	.514	.073	.000
	28	100	.413	.542	.962	.130	.486	.927	.000
	29	105	.000	.000	.013	.870	.000	.000	.000
	30	108	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	n	46	59	39	23	35	41	1	

<i>6-Pgd</i>	31	86	.000	.000	.000	.000	.014	.000	.000
	32	92	1.000	.000	.000	.000	.986	.049	.000
	33	100	.000	.000	1.000	1.000	.000	.951	.000
	34	107	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	1.000
		n	46	61	39	24	36	41	21
<i>Ldh</i>	35	92	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.119
	36	100	1.000	.000	1.000	1.000	1.000	.000	.881
	37	110	.000	1.000	.000	.000	.000	1.000	.000
		n	46	61	39	24	36	41	21
	<i>Ald</i>	38	90	.000	.000	.000	.000	.000	.000
39		100	1.000	.000	.974	.000	1.000	1.000	.000
40		107	.000	1.000	.026	1.000	.000	.000	.000
		n	46	61	39	24	36	41	21
<i>Pgm</i>		41	82	.011	.000	.013	.000	.000	.000
	42	92	.967	.008	.962	.042	1.000	.000	1.000
	43	100	.022	.992	.026	.958	.000	1.000	.000
		n	46	61	39	24	36	41	21

CV=*Centropomus viridis*, CR=*C. robalito*, CN=*C. nigrescens*, CM=*C. medius*, CU=*C. undecimalis*, CX=*C. mexicanus*, EPI= *Epinephelus* (grupo externo).

n = tamaño de la muestra. No.C.= Número de carácter que corresponde a cada uno de los alelos

Variabilidad genética.

De acuerdo a las frecuencias observadas en la tabla 4, se obtuvieron los datos de variabilidad genética que se presentan en la tabla 5. El porcentaje promedio de loci polimórficos representa un 18.2% si se considera el polimorfismo intraespecífico bajo un criterio de frecuencias del 0.95 del alelo más común; mientras que si se considera con un 0.99 del alelo más común, el polimorfismo representa un 33.4%, con un intervalo que va de 18.2% en *C. robalito* y *C. medius* (siendo las menos variables), hasta el valor de polimorfismo mas grande con 54.6% en *C. undecimalis*. El número promedio de alelos por locus es 1.45. En cuanto a la heterocigosis media se aprecia un intervalo que va del 0.7% en *C. nigrescens*, hasta un 9.5% en *C. robalito*, con un promedio de 5.05%.

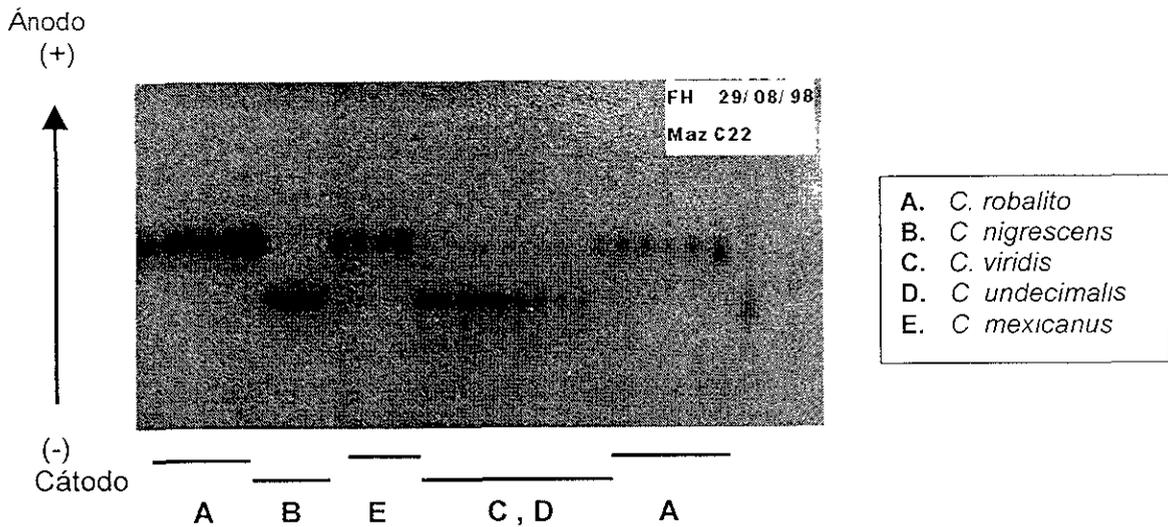


FIGURA 11. Patrón electroforético en la Fumarasa (FH). El genotipo de la especie A es homocigo 110/110; por su parte las especies B,C,D son homocigas 100/100

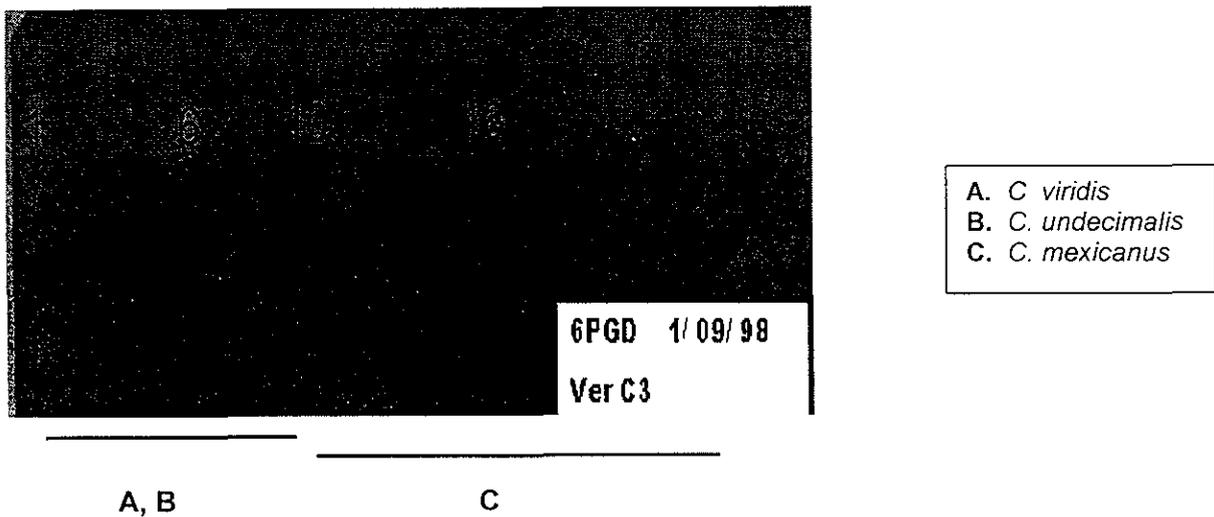
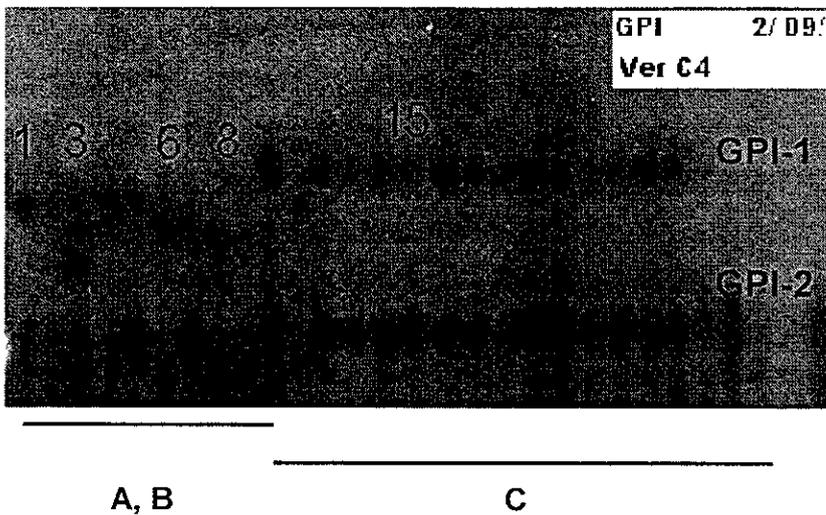
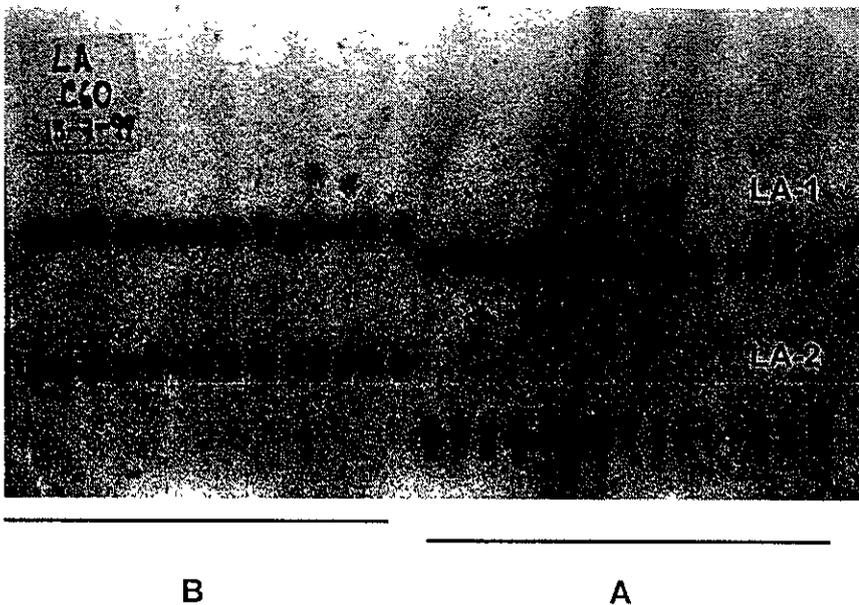


FIGURA 12. Variación en la 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD), una enzima dimérica. El genotipo de la muestra 1 es 92/92 (homocigoto), el organismo de la posición 6 es heterocigo presentando un genotipo 86/92, el genotipo de la muestra 10 es 100/100, mientras que los individuos 12 y 16 son heterocigotos con el genotipo 92/100.



- | | |
|---|-----------------------|
| A | <i>C. viridis</i> |
| B | <i>C. undecimalis</i> |
| C | <i>C. mexicanus</i> |

FIGURA 13. Variación en la glucosa fosfato isomerasa, una enzima dimérica, codificada por dos loci. El genotipo en el locus GPI-1 para la muestra 1 es 100/100 (homocigoto), el organismo en la posición 3 es heterocigoto presentando un genotipo 100/92, el genotipo de la muestra 6 y 7 es 94/100, mientras que los organismos 8 y 15 son homocigos con genotipos 94/94 y 104/104 respectivamente.



- | | |
|----|----------------------|
| A. | <i>C. nigrescens</i> |
| B. | <i>C. robalito</i> |

FIGURA 14. Patrón electroforético en la L-leucil-L-alanina. El genotipo del locus LA-1 para los individuos de la especie A todos homocigos es 92/92, los individuos de la especie B son uniformemente homocigos 100/100. En el locus LA-2 la especie A cuenta con un genotipo 90/90 mientras que la especie B es homociga 110/110.

El locus *Lgg-1** presentó polimorfismo sólo interespecífico, *C. viridis*, *C. robalito*, *C. undecimalis* y *C. mexicanus* fueron monomórficas en el electromorfo *Lgg-1/100**, y *C. nigrescens* y *C. medius* tuvieron alelos exclusivos *Lgg-1/96** y *Lgg-1/104** respectivamente. Otro de los locus que presentó únicamente polimorfismo interespecífico fue el *Ldh*; el alelo *Ldh/100** presentó frecuencia fija para *C. viridis*, *C. nigrescens*, *C. medius* y *C. undecimalis*, mientras que *Ldh/110 ** fue fijo para *C. robalito* y *C. mexicanus*. Por su parte el locus *Lgg-2** presentó el alelo *Lgg-2/90** como exclusivo de *C. nigrescens*; en *C. medius* y *C. mexicanus* el alelo *Lgg-2/100** resultó ser fijo, y fue casi fijo para *C. undecimalis*, a su vez *Lgg-2/103** fue fijo para *C. viridis* y *C. robalito*. Los loci *Gpi-1** y *Gpi-2** resultaron ser los más variables; *Gpi-1** sólo fue monomórfica intraespecíficamente en *C. nigrescens* (*Gpi-1/100**), en *C. medius* y en *C. mexicanus* (*Gpi-1/104**), mientras que en *Gpi-2** todas las especies presentaron polimorfismo intraespecífico.

Así, los loci con bandas diagnósticas para las diferentes especies fueron cinco (*La-1*, *La-2*, *Lgg-1*, *Lgg-2*, *6-Pgd*), con ocho alelos fijos o casi fijos mediante los cuales es posible distinguir a las distintas especies (*La-1/92**, *La-2/90**, *La-2/105**, *La-2/110**, *Lgg-1/96**, *Lgg-1/104**, *Lgg-2/90**, *6-Pgd/107**) de un total de 43 alelos posibles detectados en todos los taxa analizados (tabla 4).

En cuanto al porcentaje de alelos que son compartidos entre los distintos pares de especies (tabla 6) se puede observar el caso de *C. viridis-C. robalito*: *C. viridis* con 16 posibles alelos y *C. robalito* con 14 pudieran compartir 30 bandas en total, en relación a la tabla 4 se aprecia que ambas especies tienen siete electromorfos en común, esto representa aproximadamente un 23%, de estos alelos compartidos tres son de frecuencia fija (*La-1/100**, *Lgg-1/100**, *Lgg-2/103**) lo que corresponde a un 10%. En cuanto al par de especies *C. viridis-C. undecimalis* se puede observar que con un 38% de sus alelos compartidos (de los cuales solo un 9% son monomórficos) son el par de especies con un mayor porcentaje de similitud, situación similar que se presenta en *C. nigrescens-C. viridis* (con un 30%) y en *C. mexicanus – C. robalito* (con un 31%). Se observa también el caso de pares de especies cuyo porcentaje de similitud es bajo siendo las menos relacionadas, tal es el caso de *C. medius – C. viridis* solo con un 14% de alelos compartidos. Un resumen de esta información se muestra en la tabla 6, la cual permite observar de forma generalizada las semejanzas entre los pares de especies.

Tabla 6. Número total de electromorfos (alelos) compartidos por cada par de especies del género *Centropomus*.

Especie / Alelos presentes	CV	CR	CN	CM	CU	CX
<i>C. viridis</i> (CV)	*****					
<i>C. robalito</i> (CR)	7 (23)	*****				
<i>C. nigrescens</i> (CN)	10 (30)	6 (19)	*****			
<i>C. medius</i> (CM)	4 (14)	6 (22)	7(23)	*****		
<i>C. undecimalis</i> (CU)	13 (38)	6 (19)	8(23)	6 (19)	*****	
<i>C. mexicanus</i> (CX)	8 (26)	9 (31)	6(19)	7 (25)	9(27)	*****

En la parte superior de la tabla se tienen a los alelos presentes en cada especie. El porcentaje correspondiente al número de electromorfos que se comparten se presentan entre paréntesis.

Con base en la información anterior, se propone una clave de identificación de las especies analizadas en este trabajo (Cuadro 1) utilizando los caracteres electroforéticos estudiados. Como puede apreciarse en este cuadro, algunas de las enzimas presentaron bandas exclusivas en una determinada especie, como es el caso del alelo *6-Pgd/107** presente con frecuencia fija sólo en *C. robalito*; de igual manera, el locus *Lgg-1** con los electromorfos *Lgg-1/104** y *Lgg-1/96** fueron diagnósticos para *C. medius* y *C. nigrescens* respectivamente. En algunas especies no se detectaron loci monomórficos que fueran exclusivos para su diagnóstico (ver tabla 4 y 5), como *C. viridis*, quien pudo identificarse entonces al considerar a los loci *La-1** y *Lgg-2**. En *C. mexicanus* al no encontrar un loci monomórfico exclusivo, se tomó en cuenta al alelo *6-Pgd/100** cuya frecuencia de 0.951 nos permitió discernir entre su especie más cercana (*C. robalito*) con un porcentaje tan sólo del 0.05% de error. Por su parte, el robalo blanco (*C. undecimalis*) presentó ambos casos, es decir, para diferenciarla de su especie más cercana (*C. viridis*) se optó por tomar a dos loci en los cuales hubiera un alelo diferente a los electromorfos considerados para *C. viridis* y con una frecuencia cercana a 1.0 (Cuadro 1).

Tabla 7. Distancias genéticas de Nei (1972), entre pares de especies del genero *Centropomus* a partir de la cuales se realizó el análisis de agrupamiento mediante Neighbor-Joining.

	CV	CR	CN	CM	CU	CX	EPI
CV	0.0000						
CR	1.0599	0.0000					
CN	0.6928	2.8420	0.0000				
CM	2.2448	1.3933	1.5729	0.0000			
CU	0.2561	1.7279	0.6539	1.0066	0.0000		
CX	1.0338	0.5712	1.2930	0.6691	0.8577	0.0000	
EPI	1.7326	2.3311	1.3377	1.7202	1.3282	2.4872	0.0000

En cuanto a la inferencia filogenética, los análisis de parsimonia, máxima verosimilitud y de distancia (Neighbor-Joining) se utilizaron para conocer las relaciones de parentesco entre estas seis especies de robalos utilizando como grupo externo al género *Epinephelus*. Los árboles obtenidos de estos algoritmos se muestran en las figuras 15,16,17,18 y 19. Los valores de confianza del bootstrapping de todos los análisis se registraron en la tabla 11.

De esta manera, el cladograma de la figura 15 obtenido mediante el método de maximum – likelihood, es el resultado de analizar 921 árboles. En este se puede observar una politomía en la base, dentro del género *Centropomus* resalta la formación de dos grupos, el primero constituido por ((*C. undecimalis* + *C. viridis*) *C. nigrescens*), y el otro agrupamiento incluye a ((*C. robalito* + *C. mexicanus*) *C. medius*). El largo de las ramas que representan el número de cambios acumulados entre linajes, y los límites de confianza para cada rama de este árbol aparecen en la tabla 8. De estos se puede observar que el largo de las ramas, entre las especies *C. viridis* y *C.undecimalis* presentan valores cercanos (0.077 y 0.046 respectivamente), en coincidencia con los intervalos de confianza más pequeños en relación al largo de las ramas, es decir, estadísticamente presentaron las desviaciones más pequeñas, aproximadamente 0.05 (que para *C. viridis* el valor se obtiene restando al largo de la rama el valor inferior o superior de su intervalo de confianza: $0.07736 - 0.02862 = 0.04874 \approx 0.05$). El caso contrario se presenta en el par de especies *C.mexicanus* y *C. robalito*, las que difirieron considerablemente en cuanto al largo de las ramas: 0.080 y 0.207 respectivamente, además de que sus intervalos de confianza fueron grandes con respecto al largo de rama (aproximadamente 0.1).

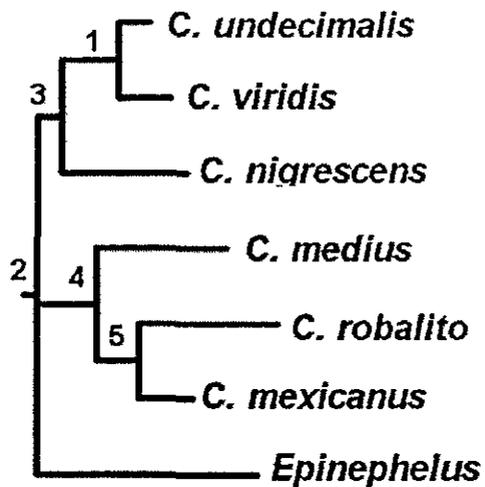


FIGURA 15. Cladograma inferido mediante análisis de “maximum-likelihood” utilizando a las frecuencias alélicas como caracteres continuos y transformándolos a valores de distancias genéticas. Los números corresponden a los distintos nodos entre ramas y son presentados en la tabla 8.

Tabla 8. Valores del largo de las ramas con sus respectivos intervalos de confianza correspondientes al árbol obtenido mediante “maximum-likelihood”. El programa analizó un total de 921 árboles. Los números de los nodos se refieren a los mostrados en la figura 14.

Nodos entre ramas		Largo de la rama	Limites de Confianza
2	3	0.03446	-0.05692 , 0.15091
3	1	0.08416	0.00102 , 0.19010
1	CU	0.04656	0.00402 , 0.10077
1	CV	0.07736	0.02862 , 0.13947
3	CN	0.18553	0.07890 , 0.32139
2	4	0.08829	-0.01528 , 0.22026
4	CM	0.19243	0.07993 , 0.33579
4	5	0.06201	-0.02788 , 0.17655
5	CR	0.20761	0.09603 , 0.34979
5	CX	0.08059	0.00847 , 0.17249
2	EP	0.32645	0.15918 , 0.53959

En la figura 16 se muestra el árbol consenso obtenido del análisis de “maximum – likelihood” a partir del remuestreo por “bootstrap”.

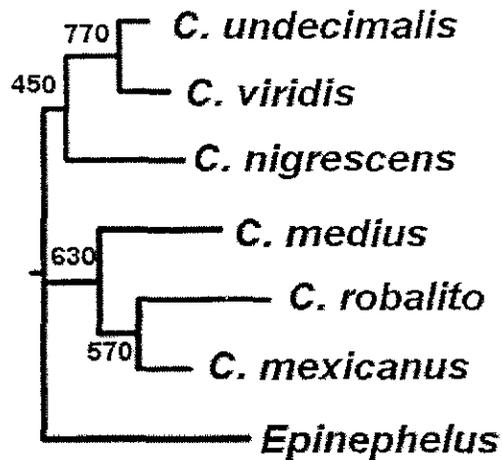


FIGURA 16. Cladograma de consenso inferido mediante análisis de "maximum-likelihood" utilizando 1000 réplicas por bootstrap. Los números corresponden a las frecuencias de ocurrencia de los nodos.

El árbol consenso resultante del análisis de Neighbor-Joining es presentado en la figura 17 y es congruente en su topología con el anterior, no obstante de que los grupos formados mediante el "bootstrap" presentaron porcentajes de aparición muy bajos, todos menores al 50%, mostrando que el soporte estadístico de éste análisis fue menor que en el primer algoritmo.

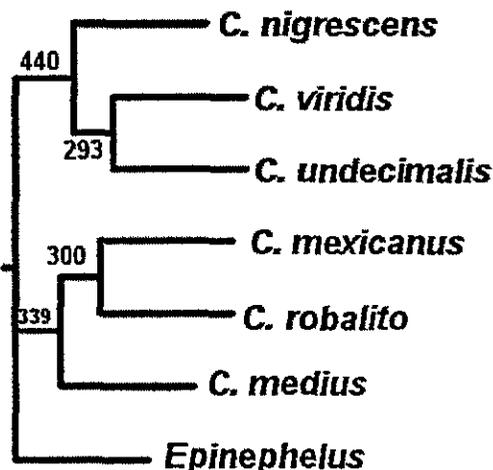


FIGURA 17. Árbol obtenido mediante el análisis de Neighbor-Joining y como resultado de las frecuencias génicas transformadas a distancias genéticas (Nei, 1972). Los números representan la frecuencia con la que se presentaron los grupos encontrados del análisis de remuestreo por "bootstrap" mediante la utilización de 1000 réplicas.

En el caso del análisis de parsimonia, el árbol de consenso encontrado (Figura 18) se obtuvo a partir de la codificación de las frecuencias de cada uno de los alelos como presencias o ausencias dando como resultado un total de 43 caracteres utilizados (Tabla 9). Por ejemplo, para *C. nigrescens* el carácter 1 y 3 registrados en la tabla 9, corresponden al alelo *La-1/92** y *La-1/100** los cuales tuvieron una frecuencia de 0.987 y 0.013 respectivamente (tabla 4), a las que se les asignó el valor de 0 (carácter plesiomórfico o ancestral) dado que al compararlas con el grupo externo éste último presentaba el mismo valor de carácter. En este análisis se observa una gran coincidencia en el agrupamiento de las especies con los resultados de los algoritmos anteriores. En general el resultado de la aplicación del "bootstrap" generó un mayor porcentaje de aparición de los grupos en contraste con los métodos anteriores.

Tabla 9. Matriz que presenta la transformación de los datos de cada una de las frecuencias alélicas de las diferentes especies de *Centropomus* a caracteres de estado mediante su codificación en código binario (presencias o ausencias) para su análisis por parsimonia.

Especie	Número de Carácter																																																
	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3						
CV	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0					
CR	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
CN	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0		
CM	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1			
CU	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0		
CX	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		
EPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los números de carácter que aparecen en la parte superior de la tabla son el número que le corresponde a cada uno de los electromorfos (ver tabla 4), que en total suman 43.

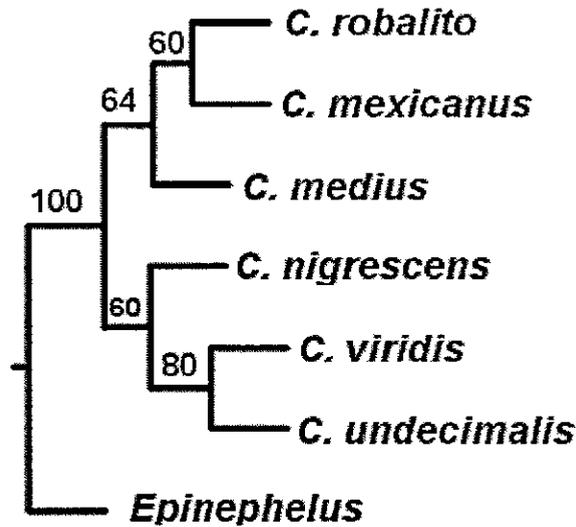


FIGURA 18. Árbol resultado del análisis de parsimonia de Wagner. Los alelos fueron tratados como caracteres. Este es el cladograma de consenso de mayoría del análisis de remuestreo por "bootstrap" mediante 100 réplicas. Los números de los nodos se refieren a la frecuencia de aparición de los grupos monofiléticos resultantes de este análisis.

En el análisis de parsimonia se optó también por seleccionar sólo aquellos caracteres que fueran informativos, tomando como referencia los caracteres presentes en el grupo externo (ver tabla 9). Así, se omitieron los caracteres exclusivos de una sola especie y que representa autapomorfías (caracteres 4, 7, 9, 11, 12, 22, 23, 29, los cuales corresponden a los alelos *La-2/90** y *La-2/110**, *Lgg-1/96** y *Lgg-1/104**, etc.) los alelos exclusivos del grupo de los Centropómidos (sinapomorfías no informativas: 8,15,17,25,28,30,38) y los alelos que ocurrieron tanto en los Centropómidos como en los meros (simplesiomorfías: caracteres 20, 21, 31, 41). De esta manera, los 43 caracteres originales presentados en la tabla 9, se reducen a 24 caracteres que son registrados en la tabla 10; el árbol producto de este análisis se presenta en la figura 19, y se observa que manifiesta los mismos agrupamientos que en todos los dendogramas anteriores.

En general, de acuerdo con la información mostrada en la tabla 11, los análisis de parsimonia tuvieron el mejor soporte estadístico al presentar los valores mayores del análisis por "bootstrap", además de que la topología entre el grupo interno y el externo queda mejor representada ya que el grupo interno se observa bien conformado y totalmente separado del grupo externo, lo que puede deberse a la cantidad mayor de caracteres analizados. El análisis de máxima verosimilitud tuvo un buen soporte estadístico, similar al análisis de parsimonia con 24 caracteres, y también se presentó el largo de las ramas y los intervalos de confianza respectivos como un parámetro de la confiabilidad de los agrupamientos, y que concuerdan con los valores de bootstrap. Por ejemplo el clado *C. viridis-C. undecimalis* fue soportado con un 77% de incidencia además de que como ya se mencionó sus intervalos de confianza fueron los más estrechos en contraste con el clado *C. robalito-C. mexicanus* donde su valor de bootstrap alcanzó apenas un 57% y un intervalo de confianza amplio (y por tanto mayor desviación con respecto a su largo de rama) . Por último, el análisis de agrupamiento por Neighbor-Joining presentó los valores de sustento estadístico más bajos, todos menores del 50%, el clado *C. viridis – C. undecimalis* y *C. robalito- C. mexicanus* tuvieron sólo un 30% de soporte de bootstrap.

Tabla 11 . Valores de soporte de los nodos resultantes del análisis de bootstrap expresados como el porcentaje de aparición de los diferentes grupos de especies formados mediante los distintos métodos de agrupamiento aplicados para la obtención de las relaciones de parentesco del género *Centropomus*.

Grupo de especies	Máxima verosimilitud	Neighbor-Joining	Parsimonia 43 caract.	Parsimonia 24 caract..
<i>CV+CU</i>	77	30	80	85
<i>(CV+CU)CN</i>	45	44	60	42
<i>(CR+CX)</i>	57	30	60	57
<i>(CR+CX)CM</i>	63	34	64	60

Los resultados de variabilidad genética, con un 95% de confianza, fueron congruentes con otros estudios ya que, de acuerdo con Hartl y Clark (1989), el grupo de los peces presenta un polimorfismo aproximado del 15% y una heterocigosis del 5%, lo que concuerda con un 18% y un 5% respectivamente en el presente trabajo.

Dado que las aloenzimas representan un marcador confiable (Hillis, 1987; Shaklee *et al.*; 1982; Avise, 1975; Richardson *et al.*, 1986) en el establecimiento de diferencias interespecíficas, a que son relativamente fáciles de obtener y que tienen un bajo costo en comparación con marcadores moleculares basados en técnicas de manipulación de ADN, fueron utilizadas con buenos resultados tanto para la identificación de las especies de robalo que conforman su pesquería, como para evaluar sus relaciones de filogenia utilizando tamaños de muestra mayores a los analizados por Tringali *et al.*, 1999b, a fin de que este incremento permitiera una mayor certidumbre de las diferencias interespecíficas en el género. Adicionalmente y a fin de analizar con mayor profundidad las relaciones genealógicas entre los grupos estudiados, se aplicaron diversos métodos de reconstrucción filogenética para estimar la congruencia de los resultados obtenidos en estos análisis y las filogenias de estudios realizados anteriormente (Rivas, 1986; Tringali *et al.*, 1999b).

En estudios de taxonomía es importante la existencia de diferencias basadas en la presencia de alelos exclusivos (fijos) en las especies, los que pudieron ser encontrados en estas comparaciones interespecíficas, además se contó con un tamaño de muestra suficientemente amplio que permitió detectarlos, ya que en general, al trabajar con caracteres electroforéticos es importante considerar que contar con un número de loci y un tamaño de las muestras adecuados (Richardson *et al.*, 1986) permiten dar solidez a los estudios que se han de realizar.

Las enzimas utilizadas en el estudio sobre filogenia del género *Centropomus* por Tringali (1999b) fueron 19 (27 loci) siendo este número suficientemente representativo; sin embargo el tamaño de muestra fué pequeño, con una media de 5 individuos en la mayoría de las especies (a excepción de *C. undecimalis*). En el presente trabajo se intentó en lo posible coleccionar un tamaño de muestra mayor que con seguridad fuera representativo de cada especie, teniendo así una media de 41 organismos. Los alelos exclusivos encontrados en

distancia es una medida más directa de la cercanía filogenética entre los pares de especies analizados.

Por su parte el método de máxima verosimilitud dio valores de bootstrap similares al análisis de parsimonia, confirmando que ambos métodos fueron de los algoritmos más confiables en la inferencia de las relaciones de parentesco de estos peces. En el análisis de máxima verosimilitud se dio además el largo de las ramas, que se considera corresponde con las tasas de evolución de las proteínas de los marcadores utilizados (Shaffer *et al.*, 1991), y sus respectivos intervalos de confianza. En algunos pares de especies (*C. viridis* – *C. undecimalis*) el largo de las ramas fueron similares, Shaffer *et al* (1991) mencionan que cuando el largo de las ramas de las especies agrupadas son parecidas las tasas de evolución son relativamente constantes. En el caso de *C. robalito* – *C. mexicanus* quienes se caracterizaron formando un clado, el largo de las ramas fueron muy diferentes, lo que tal vez es resultado de la ausencia de las especies con las que cada una de las anteriores están más emparentadas y con las que forman clados independientes en las filogenias reportadas por Rivas (1986) y por Tringali *et al* (1999b).

La topología obtenida por el conjunto de análisis que se llevaron a cabo en este estudio, agrupan a las seis especies de Centropómidos de manera muy similar. Los clados formados fueron los siguientes: ((*C. undecimalis* + *C. viridis*) *C. nigrescens*), y ((*C. robalito* + *C. mexicanus*) *C. medius*). Las relaciones filogenéticas determinadas en el presente estudio por medio de caracteres isoenzimáticos fueron en general coincidentes con las hipótesis basadas en el análisis de datos morfológicos por Rivas (1986), al igual que con los análisis de isoenzimas que reportó Tringali *et al* (1999b). No obstante, hay algunas diferencias: las distinciones más notables entre estas hipótesis filogenéticas son las incongruencias existentes entre la posición de *C. mexicanus* incluida por Rivas en el grupo *C. undecimalis*; mientras que Tringali la agrupa sólo con *C. parallelus* en un clado independiente. En los dendogramas encontrados en esta tesis, debido a la imposibilidad de contar con todas las especies del grupo, se derivaron algunas diferencias como es el caso de *C. mexicanus* quien se agrupa con *C. robalito*, en tanto que, *C. medius* en los análisis de los estudios mencionados, forma un clado independiente sólo con *C. pectinatus*. Lo anterior se ve reflejado en los valores de distancia genética de *C. robalito*, *C. medius*, y *C. mexicanus*, con respecto a las demás especies, que en ocasiones resultan más grandes que las que se observan al compararlas con el grupo externo. Una situación similar se presenta en el soporte estadístico de las ramas, donde se logran observar los valores más bajos en los nodos que conectan a estas especies con el grupo de *C. undecimalis*, a excepción del análisis

de parsimonia. Con respecto a esto, cabe mencionar que resulta lógico esperar poco soporte estadístico en métodos como el Neighbor-Joining, puesto que sus resultados se basan en la cercanía o similitud de los grupos, es decir, este análisis tiene los valores más bajos de soporte de las ramas debido a que los taxa no presentan suficientes similitudes por la falta de algunas especies del grupo, lo que se traduce en distancias significativas y soporte incipiente. Algo similar sucede con el análisis de Maximum likelihood al observar los intervalos de confianza muy grandes (y en algunos casos son negativos) indicando una gran variabilidad por la carencia de los caracteres de los grupos intermedios. En el análisis de parsimonia al determinar los estados del carácter se están omitiendo caracteres (sinapomorfías) que no están representados debido a la falta de las especies restantes del género, por lo que existen grupos con aparente soporte estadístico como es el caso del clado formado por las especies *C. robalito-C.mexicanus*, las cuales según Rivas (1986) y Tringali *et al* (1999b), pertenecen a grupos de distinto origen.

Lo anterior es un reflejo de las diferencias entre los métodos de distancia y de parsimonia; mientras que en Neighbor Joining no hay soporte en las ramas por que las distancias entre una especie y otra son grandes, en parsimonia sí hay soporte estadístico en las ramas por que no están incluidos todos los caracteres. Esto último es una desventaja en la parsimonia ya que si no es posible representar a todo el grupo, existe carencia de datos que en ocasiones resulta en topologías poco objetivas aunque con aparente soporte estadístico puesto que este método toma en cuenta la información disponible para generar el árbol más parsimonioso sin importar si el grupo está o no completo.

Teniendo en consideración que los algoritmos filogenéticos asumen distintas maneras de explicar dichas relaciones entre los taxa debido a los supuestos que cada uno emplea, además de que cada uno presenta ciertas ventajas y desventajas, y de lo cual ya se ha hecho referencia, en este trabajo se puede considerar que estos métodos fueron complementarios, mientras en el análisis de Neighbor-Joining, aunque los valores de bootstrap fueron muy bajos, se obtuvieron las distancias genéticas que son una medida más cuantificable de la cercanía filogenética entre las especies, en el análisis de Maximum likelihood se dan los intervalos de confianza, por otro lado la parsimonia dio la mayor confiabilidad de bootstrap; es decir, las características que presenta un método pueden ser complementadas o reforzadas con las características de otro algoritmo.

Una de las diferencias respecto del trabajo de Tringali *et al* (1999b) que es preciso resaltar, son las referentes al triplete de especies (*C. undecimalis*, *C. viridis*, *C. poeyi*). Mientras

que Rivas trataba a *C. undecimalis*, *C. viridis* como un par de especies transistmicas, como lo sugerían los caracteres morfológicos que agrupaban a ((*C. undecimalis*, *C. viridis*) *C. poeyi*)), Tringali (1999b) mediante las secuencias de ADN mitocondrial, a diferencia del análisis de parsimonia y el fenético de los datos isoenzimáticos que no fueron favorecidos estadísticamente, define al grupo (*C. viridis* (*C. undecimalis*, *C. poeyi*)) con un mayor soporte estadístico. Esto es indicativo de que *C. viridis* es la especie más cercana del grupo formado por el par de especies *C. undecimalis* - *C. poeyi*. En el presente análisis, aunque se logra caracterizar al grupo *C. undecimalis*, la ausencia de *C. poeyi* no permite definir claramente a este grupo, situación que nuevamente se logra percibir en una falta de soporte estadístico.

Sin embargo, a pesar de la carencia del grupo completo de especies del género *Centropomus*, las comparaciones de los resultados de isoenzimas utilizados en el presente trabajo para inferir las relaciones genealógicas del grupo, coinciden con lo encontrado por Tringali (1999b) en cuanto a la tendencia evolutiva de la formación de grupos con base en el tamaño de los organismos que componen a las diferentes especies, y además de una marcada influencia de la salinidad en la biología y distribución en los grupos evolutivos formados. De esta manera, se logran observar dos clados: uno es el formado por ((*C. undecimalis*, *C. viridis*) *C. nigrescens*)), especies que, en general, son las que presentan el mayor tamaño dentro del género, ya que los adultos alcanzan tallas de hasta 100 cm de longitud (Chávez 1963; Rivas 1986; FAO 1995); un segundo grupo es el formado por ((*C. robalito*, *C. mexicanus*) *C. medius*)), que presenta tallas en los adultos que no van más allá de los 30-35 cm en la primera especie, mientras que en la segunda la talla máxima reportada (Rivas, 1986; Tringali, 1999b) es de 40 y 60 cm respectivamente, y en la última especie las tallas máximas reportadas fueron de 45-55 cm (Rivas 1986; FAO 1995). Otra característica es que los adultos de todas las especies de robalo se caracterizan por encontrarse tanto en el medio marino como en el dulceacuícola (Rivas, 1986; Tringali *et al.*, 1999b; Muhlia-Melo *et al.*, 1995), sin embargo se ha observado que los adultos de *C. mexicanus* y *C. robalito*, generalmente habitan en zonas cercanas a flujos permanentes de agua dulce (como desembocaduras de ríos, estuarios, etc.), y hasta la fecha, los reportes de la presencia de adultos de estas especies en aguas oceánicas es exclusivamente en las épocas de reproducción (Tringali *et al.*, 1999b); mientras que los adultos de *C. undecimalis*, *C. viridis* y *C. nigrescens*, que se caracterizan por formar el grupo *undecimalis* (Rivas 1986), pasan la mayor parte de su vida en aguas oceánicas (Tringali *et al.*, 1999b).

Esto representa un rasgo de gran interés que debe ser estudiado en términos de los mecanismos responsables de los procesos de especiación del grupo, dada la gran cantidad de información al respecto que es posible obtener de ello.

Considerando la biología del género, y en especial, el hecho de que todas las especies de robalos necesitan de agua con cierta salinidad para reproducirse, dado que el esperma solo es viable en altas salinidades (Seaman y Collins, 1983), junto con la evidencia del hábitat en el grupo ancestral *Lates*, se puede considerar que los ancestros recientes de las especies del género *Centropomus* habitaban únicamente en el mar y posteriormente se fueron desplazando hacia aguas interiores.

Hace aproximadamente 3 millones de años, ascendió el istmo de Panamá ocasionando la fusión de Centroamérica con la parte sur y norte del continente Americano. Durante ese proceso, la conexión marina entre los océanos Pacífico y Atlántico fue interrumpida; esta emergencia en el Plioceno del Istmo de Panamá inició un proceso evolutivo a gran escala (Bermingham *et al.*; 1997) al terminar con el intercambio de fauna entre ambos océanos que había persistido desde el Mesozoico (Stewart, 1987). A este respecto han habido diferentes estudios basados en observaciones de taxa formados por especies "hermanas" encontrados en ambos lados del istmo de Panamá; algunos ejemplos de éstas son los géneros *Abudefduf*, *Bathygobius*, *Rypticus* (Stewart, 1987; Bermingham *et al.*, 1997), *Dominator latifrons* y *Dominator maculatus* (Ayala, 1988), entre otras. La separación de estas especies por una barrera geográfica, permite suponer que han pasado por un proceso de especiación alopátrica, generando un aislamiento reproductivo que resulta en divergencia genética. La cantidad de divergencia genética en los diferentes taxa en general habían sido basadas en medidas tradicionales como la morfología (Stewart, 1987), no obstante, la aparición de las técnicas moleculares en la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies que evolucionaron por medio de mecanismos de aislamiento geográfico, hacen posible calcular con mayor precisión las tasas de evolución acordes con eventos geológicos y de esta forma especular en la conformación de "relojes moleculares" (Avice, 1994), para ser utilizados como referentes de tiempos evolutivos en estudios de filogenia.

La emergencia del istmo de Panamá ha sido implicada en la especiación de algunos de los grupos de Centropómidos (Rivas, 1986; Tringali *et al.*, 1999b). En los árboles obtenidos en el presente trabajo, uno de los pares de especies más relacionadas genealógicamente fueron *C. robalito*-*C. mexicanus* (el valor de distancia genética fue 0.5712). Mientras que *C. robalito* habita en el océano Pacífico, *C. mexicanus* se distribuye en el Atlántico; de esto podría

inferirse que estas especies comparten un origen cercano y que el proceso de especiación que prevaleció fue el originado por el istmo de Panamá, mismo que probablemente constituyó una barrera geográfica en la población ancestral dando lugar a una especiación alopátrica. Lo anterior concuerda con la filogenia obtenida por Rivas (1986) y la reportada por Tringali *et al* (1999b), donde *C. robalito* forma un clado con *C. ensiferus*, la cual al igual que *C. mexicanus* habita en el Atlántico, haciendo evidente que *C. robalito* presenta cercanía filogenética con especies del Atlántico. Si a lo anterior aunamos el hecho de que especies como las pertenecientes al grupo *C. undecimalis*, se caracterizan por presentar una mayor afinidad a habitar ambientes marinos, se apoya la conclusión de Rivas y Tringali acerca de la presencia de especiaciones transistmicas entre pares de especies.

C. undecimalis - *C. viridis* son el par de especies que tuvieron la menor distancia genética (0.2561) resaltando su cercanía filogenética, una de ellas habita en el Golfo de México (*C. undecimalis*), mientras la otra se distribuye en el Pacífico (*C. viridis*). A este respecto, Tringali (1999b), define al grupo (*C. viridis* (*C. undecimalis*, *C. poeyi*)) acentuando que *C. viridis* es la especie hermana del grupo formado por el par de especies *C. undecimalis* - *C. poeyi*, por lo que *C. viridis* y *C. undecimalis* no representan especies transistmicas. Así, al no tener representado a *C. poeyi* en el presente trabajo, es de esperar que en los resultados de nuestros análisis *C. undecimalis* - *C. viridis* hayan presentado la distancia genética más pequeña, sin embargo el soporte estadístico en este clado para el análisis de Neighbor joining fué bajo, mientras que en el de parsimonia el soporte obtenido es alto, situación que se explica dada la carencia de representación de todos los caracteres derivados en cada grupo evolutivo, y que da relaciones si bien coincidentes en la topografía del árbol, poco confiables en cuanto al soporte estadístico. En este caso la ausencia de *C. poeyi* no permite obtener el soporte estadístico que en tal caso habría de esperarse en el grupo *C. viridis* - *C. undecimalis* - *C. poeyi*, no obstante, los resultados en cuanto a la cercanía filogenética entre *C. viridis* y *C. undecimalis* sugieren la posibilidad de que, el proceso de divergencia entre *C. viridis* y el ancestro de *C. undecimalis* y *C. poeyi* ocurrió previamente a la emergencia del istmo de Panamá (Tringali *et al.*, 1999b) y posteriormente se vio acentuado por dicho evento, en tanto que a través de un posterior proceso de especiación se dio lugar a éstas dos últimas especies.

En concordancia con los resultados de Rivas (1986) y Tringali *et al* (1999b), los grupos resultantes de los análisis encontrados en el presente estudio y evidentemente, la presencia de una barrera geográfica representada por el istmo de Panamá, sugieren que tuvo lugar una

especiación alopátrica y que posteriormente, ocurrieron procesos de especiación en cada cuenca oceánica posiblemente a través de especiación simpátrica, dando origen a las especies que actualmente se distribuyen en ambos océanos.

En el presente trabajo se han mencionado las dificultades que implica la identificación de algunas de las especies de Centropómidos. La identificación morfológica de estos peces durante las colectas realizadas en ocasiones no fue factible o no era confiable, esto dado por factores ya mencionados, tales como que en los juveniles (que es en donde las semejanzas morfológicas son aún más evidentes) colectados algunos de los caracteres diagnósticos aún no se manifiestan, o incluso en los adultos éstos caracteres no están presentes o se sobrelapan; lo anterior aunado a que en ocasiones no se tiene la posibilidad de contar con el ejemplar para su reconocimiento posterior, o a veces los peces están muy maltratados lo que afecta a algunas de las características de diagnóstico (falta de escamas, espinas rotas, etc.). Dado lo anterior, la morfología en algunos caso permitió diferenciar a los grupos de especies que son más disímiles entre sí, aunque al identificar a las especies más cercanas en ocasiones hubo algunas dificultades debido a lo ya dicho con anterioridad. Por esta gran similitud de las especies y por la coexistencia de las mismas, durante las pesquerías las capturas se realizan indistintamente sobre diferentes especies asignando un nombre general (por ejemplo robalo o chucumite) a los peces capturados. Es en estos casos donde la electroforesis contribuye de manera importante en la identificación específica. En el presente trabajo, con las diferencias electroforéticas "diagnosticas" encontradas se pudieron establecer patrones para la caracterización de las seis especies colectadas, lo que nos permitió proponer una clave bioquímica mediante la cual se llevó a cabo la identificación de dichas especies de una manera confiable e independientemente del estadio de su ciclo de vida, de las condiciones de los ejemplares, o si solo se contaba con el tejido. Los resultados de estos caracteres determinados genéticamente, podrán reforzar o complementar los análisis morfológicos y merísticos, contribuyendo así a incrementar la confianza en la determinación taxonómica.

Debido a la importancia comercial que reviste la pesquería del género en México, ha habido un aumento en su explotación (Quiroga *et al.*, 1996). En un intento de reducir el impacto de la pesca de este recurso, se han realizado algunos esfuerzos dirigidos a su manejo y conservación. En el Golfo de México la pesquería de tres de estas especies está sujeta a una reglamentación en el Diario Oficial de la Federación a partir de marzo de 1994 y que sigue vigente, para el robalo blanco y robalo prieto se estableció una veda que comprende el

periodo del 15 de mayo al 30 de junio en la zona de Barra Chachalacas, Veracruz, a Soto la Marina, Tamaulipas; y del 1° de julio al 15 de agosto de Barra Chachalacas a Barra Tonalá, Veracruz. La suspensión de la captura del chucumite en aguas interiores del estado de Veracruz, se dispuso en el periodo del 1° al 15 de marzo y del 16 al 30 de abril. En el Pacífico no hay veda para ninguna especie.

Es preciso señalar que, la especie conocida comúnmente como chucumite, que es una de las más abundantes en la pesquería del puerto de Alvarado, Ver. ha sido reportada en el Atlas pesquero de México (1994) y por Quiroga *et al* (1996), como *C. parallelus*; sin embargo en las colectas llevadas a cabo en el transcurso de este trabajo se observó que en general a los Centropomidos sobre todo en etapa juvenil, donde son relativamente pequeños (15-30 cm) y parecidos en su morfología, se les llama chucumite. Los ejemplares que nos fueron vendidos como chucumite, son *C. mexicanus* de acuerdo con las claves de Rivas (1986), y no se logró coleccionar ningún espécimen de *C. parallelus*. En las costas del Pacífico ocurre una situación muy similar, en especial con las especies de mayor tamaño, dado que en las localidades donde son capturados de manera intensiva se les conoce indistintamente como robalos siendo que corresponden a tres diferentes especies; *C. viridis*, *C. nigrescens* y *C. medius*.

Para los pescadores y consumidores de este producto tal vez no tenga ningún sentido el poder distinguir una especie de otra, pero desde el aspecto de pesquerías y conservación es de suma relevancia saber cuantas y cuáles especies se encuentran en cierta localidad y cuales son explotadas con mayor intensidad, por lo que resulta primordial conocer cuáles especies se catalogan bajo un determinado nombre común y cuáles son sus proporciones en las capturas. Los marcadores con los cuales es posible obtener una identificación precisa de las especies que conforman esta pesquería son los electromorfos exclusivos para algunas de ellas, como el locus *La-2** para *C. robalito* y *C. nigrescens*, *Lgg-1** para *C. medius* y *C. nigrescens*, *Lgg-2** para *C. nigrescens* y el *6-Pgd* para *C. robalito*. No obstante, es posible identificar las especies que no presentaron alelos únicos, mediante más de un loci, razón por la cual se propone una clave bioquímico-genética para su reconocimiento. Así, se espera que esta pueda ser una herramienta importante, junto con los caracteres de morfología (en algunos estadios) que coadyuven en el reconocimiento de estas especies y contribuyan en la resolución de los problemas anteriormente señalados.

Se ha mencionado anteriormente que las especies del género *Centropomus* son importantes económicamente para muchos estados de la República Mexicana. Su manejo requiere un conocimiento pleno en número y cantidad de las especies que son capturadas, además de otros estudios adicionales para determinar la presencia de estructura poblacional, y poder así establecer criterios de su aprovechamiento racional sin menoscabo del recurso. Se espera que este trabajo pueda contribuir a tales propósitos que son primordiales en la planificación y ordenamiento de las pesquerías sobre una base sólida con el aporte de criterios científicos.

CONCLUSIONES

- Siendo la electroforesis una técnica no muy complicada, relativamente fácil y con un costo bajo comparado con técnicas de ADN, fue una herramienta determinante y/o complementaria a la morfología en la identificación de las especies de Centropomidos.
- Se encontraron diferencias “diagnósticas” entre estas especies en un tamaño muestral significativo aplicando el método de electroforesis de isoenzimas.
- Con base en estos marcadores electroforéticos se propone una clave de identificación genética que pueda servir de apoyo a una clave morfológica en el reconocimiento más preciso de estas especies
- Las distintas maneras de codificar a los caracteres y los diferentes algoritmos aplicados resultaron en topologías muy similares en cuanto a la formación de grupos. El cladograma obtenido por el análisis de parsimonia tuvo los valores de bootstrap mayores.
- El bajo soporte estadístico en los métodos de distancia probablemente fue resultado del hecho de no contar con todas las especies del grupo, situación que se tradujo en valores de distancia entre los taxa en ocasiones poco congruentes, resaltando la sensibilidad de estos métodos a la ausencia de los caracteres informativos de otras especies. Sin embargo los resultados de las relaciones de filogenia encontradas aquí, coinciden parcialmente con las filogenias obtenidas por Rivas (1986) y Tringali *et al* (1999b).
- Es recomendable utilizar diferentes métodos de análisis en la reconstrucción filogenética puesto que cada uno de estos presenta ventajas que pueden superar las deficiencias presentes en algún otro método y enriquecer las conclusiones al proporcionar información que otros análisis no podrían dar.
- Mecanismos de especiación por alopatria mediante la presencia de barreras geográficas representadas por el surgimiento del istmo de Panamá, han sido determinantes en el aislamiento y en la diversificación de las especies.

LITERATURA CITADA

- Allendorf, F.W., N. Ryman; y F. M. Utter. 1987. Genetics and Fishery management: Past, Present, and Future. In: N. Rayman and F. Utter. (editors). Population Genetics and Fishery managment. p. 1-19. Wash. Sea Gran Program. Univ. Wash. Press. Seattle.
- Amezcua, L.F. 1996. Peces demersales de la Plataforma Continental del Pacifico Central de México. ICMYL, UNAM; CONABIO. México. 184p.
- Anuario Estadístico de Pesca.1997. SEMARNAP. Instituto Nacional de la Pesca. 241 p.
- Atlas pesquero de México. 1994. Secretaria de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca. 234 pp.
- Avise, J.C. 1975. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23:465-481.
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. United States of America. 511p.
- Ayala D. E. 1988. Estudio electroforético de cuatro especies de la familia Gobiidae (Pises: Perciformes). Tesis Maestría. UNAM. México.
- Ayala, F.J. y J.A. Kiger. 1984. Genética moderna. Ediciones Omega. Barcelona. 836p.
- Bermingham, E., S.M. Shawn., y A. P. Martin. 1997. Fish Biogeography and Molecular Clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. In. Thomas D. Kocher and Carol A. Stepien (editors). Molecular Systematics of Fishes. p. 113-128. Academic Press. Printed in the United States of America.
- Buth, D.G. 1984. The aplication of electrophoretic data in systematic studies. Annu.Rev.Ecol. Syst. 15: 501-522.
- Castro, A.J.L. 1978. Catálogo sistemático de los peces marinos que penetran a las aguas continentales de México, con aspectos zoogeográficos y Ecológicos. Inst. Nacional de la Pesca. Depto. Pesca. 298p.
- Cavalli- Sforza, L.L. y A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution. 32: 550-570.
- Chávez, H.1961. Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescipción de *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisces Centropomidae). Ciencia. 21: 75-83.
- Chávez, H. 1963. Contribución al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus spp*) del estado de Veracruz. Ciencia. 22: 141-161.

- Chávez, H. 1981. Mercado de robalo prieto, *Centropomus poeyi*, en la cuenca del Papaloapan. Ciencias pesqueras. Inst. Nal. Pesca. 1(1). 17-26.
- Curtis, H. y N.S. Barnes. 1993. Biología. Editorial médica panamericana. Colombia. 1199 pp.
- Diario Oficial de la Federación. 16 Mayo 1994.
- Dobshansky, T; F.J. Ayala; G.L. Stebbins; y J.W. Valentine.1993. Evolución. Ediciones Omega. Barcelona. 558p.
- Dowlyng, T.E; y W.M. Brown. 1989. Allozymes, Mitochondrial DNA and levels of phylogenetic resolution among four minnow species (*Notropis*: Cyprinidae). Syst. Zool. 38 (2): 126-143.1989.
- Edwards, A.W.F. y L.L. Cavalli-Sforza. 1964. Reconstruction of evolutionary trees. pp. 67- 76. In phenetic and phylogenetic classification, ed. V.H. Heywood y J. Mc Neill. Systematics Association. Volume No. 6. Systematics Association, London.
- Eguiarte, L.E. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Aspargales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. Bol. Soc. Bot. México. 56:45-56.
- Eguiarte, L.E; V. Souza; J. Nuñez y B. Hernández. 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. Bol. Soc. Bot. Mex. 60: 169-181.
- FAO. 1978. Species Identification Sheets for Fishery Purpose. Western Central Atlantic. Volume II. Food and agriculture Organization of the United Nations. Roma.
- FAO. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Volumen II. Vertebrados-parte 1. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39 (4): 783-791.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogeny inference package, version 3.5c. Distribuido por el autor., Departament of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fuentes, C. D. 1973. Contribución al conocimiento de la biología del robalo prieto (*Pisces Centropomus poeyi* Chávez) en el área de Alvarado, Veracruz, México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 37: 369-421.
- Fuentes, C. D. 1996. Panorama de la Pesca Ribereña Nacional En: Pesquerías relevantes en México: Instituto Nacional de la Pesca. SEMARNAP. Tomo II. pp.639-648.

- Gilmore, R.G; C.J. Dohone, y D.W. Cooke. 1983. Observations on the distribution and biology of east-central Florida population of the common snook, *Centropomus undecimalis*. Fla. Sci. 46: 313-336.
- Goyenechea M,G. 2000. Filogenia del género *Conopsis*, Gunther, 1858. (Serpentes: Colubridae) con un análisis cladista del grupo de pequeñas culebras de Norteamérica. Tesis Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Greenwood, P.H. 1976. A review of the family Centropomidae (Pisces, Perciformes). Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.) 29 (1): 1-81.
- Harris, H. y D.A. Hopkinson.1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1989. Principles of population genetics. 2da edición. Sinauer, Sunderland. Mass. USA.
- Hendy, M.D. y D. Penny. 1982. Branch and Bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. Mathematical Bioscience. 59: 277-290.
- Hennig, W. 1966. Phylogenetics Systematics. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Hillis, D.M., J.S.Frost; y D.A. Wright. 1983. Phylogeny and Biogeography of the *Rana pipiens* Complex: A biochemical evaluation. Syst. Zool. 32(2): 132-143.
- Hillis, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18:23-42.
- Hillis D.M; C. Moritz y B.K. Mable. 1996. Molecular systematics. Second edition. Sinauer associates, Sunderland, Mass.
- Jiménez, V.M. 1984. Contribución al conocimiento de la biología de los robalos (Centropomidae) de la laguna de Sontecomapan, Ver. Tesis Profesional. ENEP Iztacala. UNAM. México.
- Kornet, D.J; y H. Turner. 1999. Coding polymorphism for phylogeny reconstruction. Syst. Biol. 48 (2): 365-379.
- Llorente, B.J. y I.L. Vega Compiladores. 1994. Taxonomía biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de cultura económica. México. pp. 39-225.
- Mabbe, P.M. and J. Humphries. 1993. Coding polymorphic data: Examples from allozymes and ontogeny. Syst. Biol. 42:166-181.
- Mendoza, Q. F., O. Flores; y W. Sites. 1998. Genetic variation, Species status, and Phylogenetic relationships in Rose-Bellied Lizards (*Variabilis* Group) of the genus *Sceloporus* (Squamata Phrynosomatidae). Copeia 1998 (2). pp 354-366.

- Seaman, W. y M. Collins. 1983. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Florida). SNOOK. Coastal Ecology Group and National Coastal Ecosystems team. 16p.
- Selander, R.K; M.H. Smith, S.H. Yang, y W.E. Johnson. 1971. Biochemical polymorphism and systematic in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Stud. Genet. VI. Univ. Texas Publ.7103:49-90.
- Shaffer, H.B; J.M. Clark y F. Kraus. 1991. When molecules and morphology clash: a phylogenetic analysis of the north american ambystomatid salamanders (caudata: ambystomidae). Syst. Zool. 40 (3): 284-303.
- Shaklee, J.B., y C.S. Tamaru. 1981. Biochemical and morphological evolution of hawaiian bonefishes (*Albula*). Syst. Zool. 30(2). 125-146.
- Shaklee, J.B., C.S. Tamaru; y R.S. Waples. 1982. Speciation and evolution of marine Fishes studies by the electrophoretic analysis of proteins. Pacific science. Vol. 32.No. 2.
- Shaklee, J.B; F.W. Allendorf; D.C. Morizot, y G.S. Whitt, 1989. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish. Trans.Am. Fish. Soc. 118: 218-227.
- Sites, W.J., J.W. Bickham., B.A. Pytel., I.F. Greenbaum., y B.A. Bates. 1984. Biochemical characters and reconstruction of turtle phylogenies: Relationships among batagurine genera. Syst. Zool. 33(2): 137-158.
- Smith, P.J. 1994. Genetic diversity of marine fishery sources. FAO, Fish. Tech. Paper. 344/11. Rome, FAO. 53p.
- Steward, G.W. 1987. Genetic Divergence between Congeneric Atlantic and Pacific Ocean Fishes. In: N. Rayman and F. Utter. (editors). Population Genetics and Fishery managment. p. 225-246. Wash. Sea Gran Program. Univ. Wash. Press. Seattle.
- Swofford, D.L. and R.B. Selander.1981.BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics.
- Taylor, R.G. y H.J. Grier. 1993. Protandric hermaphroditism in the common snook. Snook simposium 1993, held 15-16 April 1993 at Mote Marine Lab. Sarasota Fla (Abstract).
- Taylor, R.G., H.J. Grier, y A. Whittington. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. Journal of Fish Biology. 53. 502-520.
- Tringali, M.D. y T.M. Bert,. 1996. The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 974-984.

COPIA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Tringali, M.D., T.M. Bert y S. Seyoum. 1999a. Genetic Identification of the Centropomine Fishes. Transactions of the American Fisheries Society. 128: 446-458.
- Tringali, M.D; T.M. Bert; S. Seyoum; E. Bermingham; y D. Bartolacci. 1999b. Molecular phylogenetics and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). Molecular phylogenetics and evolution. 13:193-207.
- Utter, F.M; P. Abersold; y G. Winans. 1987. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. In: N. Rayman and F. Utter. (editors). Population Genetics and Fishery managment. p. 21-24. Wash. Sea Gran Program. Univ. Wash. Press. Seattle.
- Villaseñor, J.L; y P. Dávila. 1992. Breve introducción a la metodología cladista. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 48pp.
- Wiens, J.J. y M.R. Servedio. 1998. Phylogenetic analysis and intraspecific variation: Performance of Parsimony, Likelihood, and distance methods. Syst. Biol. 47(2):228-253.
- Wiley, E.O. 1981. Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetics systematics. Wiley and Sons, New York.
- Wiley, E.O; S. Causey; D. Brooks; y V.A. Funk. 1991. The compleat cladistic. The University of Kansas. Museum of natural history. Special pub. No. 19. 158p.