



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTIMACIÓN DE HETEROSIS Y DIVERSIDAD GENÉTICA
EN DOS ESPECIES DE PEZ BLANCO *Chirostoma estor* Y
Chirostoma promelas.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ANA CARMEN DELGADILLO CALVILLO

TUTOR

DR. CARLOS GUSTAVO VÁSQUEZ PELÁEZ

COMITÉ TUTORAL:

Dr. José Manuel Berruecos Villalobos

Dr. Carlos Antonio Martínez Palacios



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.

DEDICATORIAS

A mis padres y mi hermano por todo el apoyo que siempre me han brindado y por estar siempre conmigo.

A mi familia del alma Alma, Homero y Ady.

A Karla, Marcia, Tatiana, Rennée, Verónica, Irais , Lalo y Ness, gracias por existir y estar presentes en mi vida.

A todos los amigos y compañeros del Depto. de genética y bioestadística Reyes, Marín, Luis, Joseló, Aliet, Emi, Amanda, Vianey, Diana y Memo.

A mis grandes amigos de Morelia, que me hicieron la vida mucho más agradable y nunca los olvido Dafne, Maru, Toña, Citlalic, Lidia, Chucho, Toño, Lázaro y Luis.

“Todos somos ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Carlos G. Vásquez Peláez y a los miembros del comité tutorial Dr. Carlos A. Martínez Palacios y al Dr. José Manuel Berruecos Villalobos, que me permitieron desarrollar este trabajo, por su confianza y apoyo.

Al Dr. Antonio Campos Mendoza, por todo el apoyo durante mi estancia en Morelia y por los comentarios y participación como miembro invitado del comité tutorial.

Al Dr. Juan José Valdez, por participar como miembro invitado del comité tutorial.

Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu por todo el apoyo para la realización del experimento en el laboratorio y por introducirme a la genética molecular.

Un gran agradecimiento y reconocimiento al Dr. Rogelio Alonso Morales y a la Biol. Amanda Gayosso Vázquez por todo su apoyo y paciencia para la realización del trabajo en el laboratorio y a todos los compañeros y amigos del laboratorio del departamento de Genética y Bioestadística FMVZ-UNAM.

Al Dr. Miguel Ángel Pérez Razo miembro del jurado, por sus comentarios y sugerencias.

Y muy en especial al Dr. Hugo H. Montaldo Valdenegro por todos sus atinados comentarios y sugerencias y por exigirme para realizar un trabajo de mejor calidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al personal académico y administrativo del departamento de genética y Bioestadística.

Al en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al personal académico y administrativo.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para que fuera posible la realización de esta investigación.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT- IN212508 (UNAM) y por CONACyT 080 420.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
Origen y evolución del género <i>Chirostoma</i>	3
Desarrollo y ciclo de vida de los peces	5
Distribución natural del Pez Blanco <i>Chirostoma estor</i>	6
Distribución natural del Pez Blanco <i>Chirostoma promelas</i>	6
Herramientas de mejoramiento genético en acuicultura	7
Curvas de crecimiento	8
Cruzamiento	9
Variación genética	12
Estudios sobre variación genética e identificación de especies del género <i>Chirostoma</i>	13
III. OBJETIVOS	15
IV. REFERENCIAS GENERALES	16
V. ARTÍCULO 1.	
CARACTERIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA DOS ESPECIES DE PEZ BLANCO <i>Chirostoma estor</i>, <i>C. promelas</i> Y SUS HÍBRIDOS	23
Resumen	24
Abstract	25
Introducción	26
Material y métodos	27
Resultados	31
Discusión	32
Referencias	34
VI. ARTÍCULO 2.	
EFFECTOS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO EN DOS ESPECIES DE PECES BLANCOS <i>Chirostoma estor</i> Y <i>Chirostoma promelas</i> BAJO UN DISEÑO DE CRUZAMIENTO DIALÉLICO.	40
Abstract	41
Introduction	42
Material and Methods	43
Results	46
Discussion and conclusion	46
References	51

VII. ARTÍCULO 3.	
DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI) EN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Chirostoma</i>	55
Resumen	56
Abstract	57
Introducción	58
Materiales y métodos	60
Resultados	66
Discusión	76
Conclusiones e implicaciones	78
Referencias	79
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	83

Resumen

En la Mesa Central de México se distribuyen algunas especies de peces de la familia *Atherinopsidae* del género *Chirostoma*, conocidos como peces blancos de importancia cultural, nativos de los lagos de Pátzcuaro y Chapala. Las especies *C. estor* y *C. promelas* son consideradas como poblaciones en riesgo, por lo que estudios en cultivo artificial son necesarios para su mejor aprovechamiento y conservación. Los objetivos de este trabajo fueron estimar: los parámetros de la curva de crecimiento, los efectos genéticos en el peso a través de un cruzamiento dialélico completo y la diversidad genética con el gen mitocondrial del citocromo oxidasa subunidad I COI, para dos especies de pez blanco *C. estor*, *C. promelas* y sus híbridos, hasta los 300 días de edad. Se realizó un cruzamiento dialélico completo entre *C. estor* y *C. promelas* midiendo mensualmente el crecimiento hasta los 300 días; el crecimiento se caracterizó a partir de modelos logarítmicos; los efectos de cruzamiento se estimaron para pesos obtenidos cada 30 días, a partir de contrastes ortogonales, mientras que la diversidad genética se estimó a partir de la variabilidad del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI). Los resultados mostraron un crecimiento alométrico para las dos especies y sus híbridos; *C. estor* mostró ser 65% más pesados que *C. promelas* a los 10 meses de edad. Los valores de heterosis fueron inconsistentes, siendo significativos a los 180, 210 y 300 días de -9.68%, 16.40% y -19.8% respectivamente, a lo largo del estudio. La variabilidad genética del gen COI, mostró valores de diversidad nucleotídica de 0.21 a 0.42 para los grupos de género *Chirostoma*. Se encontraron 17 haplotipos, algunos compartidos entre especies, los cuales en general, mostraron entre ellos una distancia menor al 1% indicando que estas especies se encuentran cercanas; por lo que la inconsistencia de heterosis puede ser debida a la cercanía genética entre estas especies.

Abstract

In the Mesa Central of México are distributed some fish species of the *Atherinopsidae* family, *Chirostoma* genus, also known as white fish. These are fishes of cultural importance and natives of Pátzcuaro lake in Michoacán and Chapala Jalisco. The species *C. estor* y *C. promelas* are considered as risk populations, so artificial culture studies are needed to better utilization and conservation. The objectives of this study were to estimate: the parameters of the growth curve, the genetic effects on weight through a complete diallel cross and genetic diversity in the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I COI, for two species of white fish *C. estor*, *C. promelas* their hybrids, to 300 days of age. We performed a complete diallel cross between *C. estor* and *C. promelas* measuring monthly growth up to 300 days, growth was characterized from logarithmic models, the effects of cross weights obtained were estimated for every 30 days from orthogonal contrasts, while genetic diversity was estimated from the variability of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (COI). The results showed an allometric growth for both species and hybrids, *C. estor* was shown to be 65% heavier than *C. promelas* at 10 months of age. Heterosis values were inconsistent, being significant at the 180, 210 and 300 days of -9.68%, 16.40% and -19.8% respectively, throughout the study. The genetic variability of the COI gene showed nucleotide diversity values from 0.21 to 0.42 for *Chirostoma* gender groups. We found 17 haplotypes, some shared between species, which generally showed a distance between them less than 1% indicating that these species are close, so the inconsistency of heterosis may be due to genetic closeness between these species.

I. Introducción

En los principales lagos de la Mesa Central de México, incluyendo los de Chapala y Pátzcuaro, se encuentran a diversas especies del género *Chirostoma*, conocidas comúnmente como peces blancos y charales, la principal diferencia es el tamaño que alcanzan a la madurez. (Alaye, 1993; Rojas y Sasso, 2005).

Las especies de peces blancos *Chirostoma estor* y *C. promelas* son nativas de los lagos de Pátzcuaro y Chapala, respectivamente. Estos peces representan un recurso pesquero para la región de la Mesa Central de México, por lo que son consideradas de gran importancia económica y cultural, sin embargo, debido a la pesca indiscriminada al capturar peces de todas las tallas, confundiendo a juveniles de peces blancos con charales, esto ha provocado una disminución en las poblaciones de peces blancos. Esta problemática, aunada a la contaminación, a la disminución de la superficie de los lagos y a una mala calidad del agua, ha generado que estas especies se encuentren en peligro (Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Barriga-Sosa *et al.*, 2005). Sin embargo, solamente *C. promelas* es reconocida como una especie en situación de riesgo en la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y controlada por periodos y zonas de vedas en la norma oficial mexicana NOM-032-PESC-2003, no así *C. estor*. (Martínez *et al.*, 2003; Rojas 2003b).

Debido a lo anterior, se generó interés para desarrollar cultivos con el fin de estudiar y conservar a estas especies, en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), que a partir de 1999 cuenta con dos poblaciones de peces blancos en cultivo; una de *C. estor* y otra de *C. promelas*, con los cuales se han desarrollado estudios sobre avances en el cultivo del pescado blanco, biología reproductiva, alimentación larvaria y aspectos nutricionales (Rojas 2003a).

Sin embargo, existen otros estudios en estos peces, orientados a la descripción de algunos aspectos biológicos a la biología y ecología de algunas de las especies de este género, y para el desarrollo de tecnologías de cultivo (Martínez *et al.*, 2002 y 2003). Así como estudios enfocados a esclarecer la taxonomía y relaciones filogenéticas en las diferentes especies del género *Chirostoma* (Alaye 1996a; Barriga-Sosa 2001; Pérez 2005).

No obstante, existe escasa información sobre el crecimiento que presentan estos peces en condiciones de cultivo, debido a que no se ha evaluado ni comparado el crecimiento de estas poblaciones durante la etapa juvenil, ni hasta un año de edad, lo que resulta importante para conocer la biología y las características de crecimiento, que presentan estas especies, al igual que para estimar la diversidad genética que presentan las poblaciones en cultivo en comparación con poblaciones silvestres.

Dado lo anterior, se realizó un estudio que involucro un cruzamiento dialélico completo entre estas dos especies de peces blancos y sus híbridos recíprocos bajo cultivo, con el fin de caracterizar el crecimiento, así como para estimar los efectos genéticos de cruzamiento y estimar la diversidad genética entre poblaciones, como de una estrategia que permita fundamentar un programa de mejora genética, para las poblaciones que se encuentran en cautiverio.

II. Revisión de Literatura

Origen y evolución del género *Chirostoma*

Los lagos de Chapala, Pátzcuaro, Cuitzeo, Zirahúen y Zacapu, se encuentran dentro de la Mesa Central de México, considerada como la mayor cuenca hidrológica del país. Esta cuenca se localiza en el centro de México limitado al sur por la depresión del Balsas, al este por la Sierra Madre Oriental y al oeste por la Sierra Madre Occidental, abarcando el extremo sur del altiplano mexicano que comprende el eje volcánico transversal (Barbour 1973; Domínguez 2009).

Las especies del género *Chirostoma*, pertenecen a la Subfamilia Menidiinae, Familia Atherinopsidae, Orden Atheriniformes, y son considerados endémicas de los lagos de la Mesa Central de México. La familia Atherinopsidae está representada por 18 especies y 6 subespecies clasificadas en dos grupos: El grupo Jordani al que pertenece los peces blancos o de tallas grandes, mayores a 12 cm como lo son, entre otros, *C. estor* y *C. promelas* y el grupo Arge donde encontramos a los charales, de talla pequeña menor a 12 cm como a *C. attenuatum*. (Alaye, 1993; Miller, 2005; Barriga-Sosa *et al.*, 2002).

Barbour (1973), propuso que el origen de los atherinópsidos de los géneros *Chirostoma* y *Poblana* a los que en conjunto se les conoce como peces blancos y charales, es de origen difilético, de ahí que explicaría el origen de los dos grupos taxonómicos conocidos como Jordani y Arge.

Barbour (1973) sugiere que durante el Terciario, que comenzó hace 65 millones de años, el grupo Jordani se originó a partir de un ancestro marino parecido a *Menidia*, conocido como *Menidia beryllina*, el cual se adaptó a las aguas

continentales de la Meseta Central; se cree que esta especie pudo haber penetrado desde el Océano Pacífico, por el río Balsas hacia la cuenca de Lerma-Santiago, mencionando que el patrón más viejo de distribución dentro del género lo presenta *Chirostoma humboldtianum*, considerado como un ancestro que continuaba distribuyéndose en el valle de México y que existe poca diferenciación morfológica entre las poblaciones del valle y las todavía existentes en la cuenca de Lerma.

Las últimas conexiones entre las cuencas se originaron durante el Pleistoceno (2.5 ma); la continua presencia de ambos grupos entre los drenajes del río Balsas, provocó una especiación para algunas especies del grupo Jordani ocasionado que las especies *C. lucius*, *C. sphyraena* y *C. promelas*, fueran endémicas del lago de Chapala, mientras que las especies del grupo Arge, se originaron después de que se cerró el portal del Balsas al final del Mioceno (25 ma). Una especie parecida a *Menidia* de origen marino, se aisló en la costa de México y comenzó la diferenciación dentro del género *Melaniris*. Durante este proceso el ancestro del grupo Arge se aisló en aguas continentales en el centro de México. La presencia de *Melaniris crystallina* en las partes bajas del río Verde y de *Chirostoma arge* en río Verde y el de la Laja, sugieren una posible invasión en la ruta que permitió el desarrollo de las comunidades en la cuenca de Chapala, el grupo Jordani, muestra patrones de distribución que pudieron haber resultado en la última parte del Pleistoceno (Barbour 1973; Domínguez 2009). Sin embargo, otra teoría establecida por Echelle & Echelle (1984), menciona que fueron de origen monofilético tanto el género *Chirostoma* como *Poblana* y *Menidia* provenían de un mismo ancestro parecido a *Menidia* que no comparten con *Melaniris*.

Bloom *et al.*, (2009), mencionan que la nueva tribu Menidiini de peces blancos la cual está representada por 32 especies y 4 géneros (*Menidia*, *Labidesthes*,

Poblana, y *Chirostoma*) se distribuyen a lo largo de la costa atlántica de Norteamérica, a través del golfo de México y de la Mesa Central del México. En estudios preliminares se había sugerido que *Chirostoma*, *Poblana*, y *Menidia* fueran reconocidos como un solo género bajo el nombre de *Menidia*; sin embargo, usando el gen ND2 del ADN mitocondrial encontraron que tanto el género *Chirostoma* como *Poblana*, tenían un origen monofilético dentro de su clado reconocido a *C. humboldtianum* como su ancestro común y reconociendo a estos géneros como exclusivos de la Mesa Central de México; estos resultados apoyan las teorías establecidas por Echelle y Echelle (1984).

Desarrollo y ciclo de vida de los peces blancos

Las especies de pez blanco, son ovíparas, pueden desovar todo el año y alcanzan la madurez sexual aproximadamente al año de edad, con tallas superiores a los 12 cm, iniciando su etapa reproductiva (Martínez *et al.*, 2003; Rojas, 2005), sin embargo, las especies de este género, no presentan un marcado dimorfismo sexual. Se observa que los huevos de este género, son traslucidos y esféricos, de color ámbar, con un diámetro de 0.8 a 1.2 mm, que puede llegar a variar según la especie al igual que el número de hilos adherentes (6 a 9) que presentan, los cuales le ayudan a fijarse a un sustrato (Figueroa *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2003). Después de la fertilización se forma el espacio perivitelino y se pueden observar una o varias gotas de aceite, que las contenía el huevo antes de la fertilización, estas gotas de aceite les sirven como reserva de energía para la etapa embrionaria y larval (Evans, 2006). De 7 a 8 días después, la larva eclosiona y mide aproximadamente 5 mm de longitud y conserva el saco vitelino que reabsorberá en los siguientes 5 días aproximadamente, para convertirse en alevín y ya no sufre ninguna metamorfosis (Figueroa *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2003).

Distribución natural del Pez Blanco *Chirostoma estor*.

C. estor es nativo del lago de Pátzcuaro en el estado de Michoacán. El lago de Pátzcuaro se encuentra localizado en la meseta central de México (Figura 1), a 2,043 m sobre el nivel del mar, con una longitud máxima de 20 km y 10 km en la porción más ancha y una profundidad media de 8 m. (FAO, 1974). En este lago existen cuatro especies del género *Chirostoma*: el pez blanco *Chirostoma estor*, y los charales *C. attenuatum*, *C. grandocule* y *C. patzcuaro*, (FAO, 1974), todas ellas representan un recurso pesquero debido a la importancia gastronómica y cultura que tienen para esta región (Barriga-Sosa 2003; Martínez *et al.*, 2003)

Distribución natural del Pez Blanco *Chirostoma promelas*

C. promelas, se encuentra catalogada en situación de riesgo dentro de la norma oficial mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010), y es considerada una especie nativa del lago de Chapala, en donde también podemos encontrar otros peces blancos como *C. lucius* y *C. sphyraena*. El lago de Chapala es considerado el de mayor tamaño en México (Figura 1), se localiza en el estado de Jalisco, a una altitud de 1535 m sobre el nivel del mar y forma parte de la cuenca Lerma-Chapala-Santiago. Por otro lado, existe un registro realizado en 1990, en donde se menciona que la profundidad media era de 7.2 m y decreció a 4.5 m (Moncayo *et al.*, 2003; Pérez, 2005).



Figura 1. Localización de los lagos, en la república mexicana, donde se encuentran la mayor parte de las especies de peces blancos del género *Chirostoma*.

Herramientas de mejoramiento genético en acuicultura

Generalidades

Los peces y otros especies acuícolas son una fuente importante de alimentación a nivel mundial; el consumo de productos procedentes de la pesca y de su cultivo, constituye una fuente importante de proteína para la alimentación humana y animal (FAO, 2010).

En algunas poblaciones utilizadas para la acuicultura se han implementado programas de mejoramiento genético, para obtener mejores rendimientos, aumentar la eficiencia alimenticia y obtener una mayor resistencia a enfermedades (Gjedrem, 2005). Estas mejoras se han realizado principalmente por medio de programas tradicionales de selección y cruzamiento (Falconer *et al.*, 2000; Gjedrem, 2005). Existen otras técnicas utilizadas en mejora genética acuícola, como la manipulación cromosómica, la cual interrumpe el proceso de división celular en el huevo recién fertilizado e incluye a las poliploidias. Otra técnica es la reversión sexual, que se emplea para obtener poblaciones monosexuales, debido a que alguno de los sexos presenta un crecimiento superior. Esto se puede realizar mediante cruzamientos híbridos, que sólo se aplican a combinaciones específicas de especies y ha sido utilizado principalmente en cultivo de tilapias (Gjedrem 2005), aunque también se puede lograr con tratamientos hormonales. La transgénesis es una técnica de ingeniería genética donde una secuencia de genes aislados de un organismo es insertada en otro, para obtener un rasgo nuevo o modificado (Eknath *et al.*, 1991, Tave, 1996; Gjedrem, 2005).

Curvas de crecimiento

El crecimiento se puede definir como el incremento en peso, talla y cambios en la composición corporal en un periodo determinado. Se han empleado diferentes funciones lineales y no lineales, para caracterizar las curvas de crecimiento en varias especies como aves, cerdos, bovinos, ovinos, ciervos, peces entre otros, (Aguilar *et al.*, 1983; Agudelo *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 1976; Fitzhugh, 1976; López *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2009), Estas curvas relacionan el cambio de peso o talla con el tiempo. Al describir el patrón de crecimiento en un ambiente y sistema de manejo definidos, puede permitir evaluar la importancia de algunos factores que afectan la eficiencia productiva, así como establecer los criterios de

selección para crecimiento en programas de mejoramiento genético. Dentro de los modelos no lineales más empleados para estudiar el crecimiento en diferentes especies de animales, se encuentran los de Gompertz, Brody, Richards y el modelo más usado en peces es el de Von Bertalanffy (Hopkins, 1992). Existen además otras medidas para describir el crecimiento que se han utilizado en la acuicultura, como las tasas de crecimiento absoluto, relativo y específico; estas medidas permiten evaluar la relación entre la talla del pez y el tiempo. Estas medidas son empleadas con diferentes fines, ya sea para describir el crecimiento en experimentos o como una herramienta para la toma de decisiones básicas sobre el manejo dentro de un sistema de producción (Hopkins, 1992).

La caracterización del crecimiento en los peces también se ha realizado a través de la relación peso-longitud estimada como $P=aL^b$, donde P es el peso (g) y L es la longitud total (cm) a es el origen y b es el coeficiente de alometría. La estimación de los coeficientes de alometría permite evaluar la relación entre la evolución de la longitud y el peso en los peces, lo que permite determinar el tipo de crecimiento, alométrico positivo si $b<3$ y negativo si $b>3$, (Ricker *et al.*, 1975). Determinar el tipo de crecimiento, es importante porque se puede utilizar como un índice práctico para evaluar la condición de los peces, la cual depende de varios factores tales como la disponibilidad de alimento, el estado de salud de los peces, el sexo, desarrollo de gónadas y el periodo de desoves (Santos *et al.*, 2002). Sin embargo, esta relación peso longitud, también permite hacer comparaciones morfométricas entre y dentro de las poblaciones, así como evaluar la biomasa y la dinámica de las poblaciones utilizada en pesquerías (Santos *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1999; Csirke, 1980)

Cruzamiento

El cruzamiento es el apareamiento entre individuos no emparentados o de poblaciones distintas, como lo son entre líneas, razas o especies. El efecto

genético del cruzamiento es aumentar la proporción de genes que son heterocigotos y reducir la proporción de homocigotos (Stufflebeam, 1989; Warwick and Legates 1992). El principal objetivo dentro de un programa de cruzamiento es explotar la varianza genética no aditiva (Gjedrem, 2005).

La Heterosis o vigor híbrido se puede definir como un fenómeno en el cual el desempeño de la progenie que proviene de los cruza excede el promedio de los animales progenitores, con estos resultados se esperarían heterosis positiva, sin embargo también se pueden encontrar resultados con heterosis negativas. (Warwick and Legates 1992; Falconer *et al.*, 2000; Gjedrem, 2005). Y se expresa cuantitativamente como la desviación en el promedio del comportamiento de las cruza recíprocas (híbridos) con respecto al promedio de sus padres (Van Vleck *et al.*, 1987).

Los cruzamientos son considerados como una herramienta para mejorar la producción (Warwick and Legates 1992), además de que de esta forma se puede conocer de la estructura genética de las especies en cultivo, así como supervisar la viabilidad y fertilidad de la progenie. Sin embargo, el uso de estas cruza es cuestionado por las posibles implicaciones para la conservación de la biodiversidad (Bartley 2001, Salazar *et al.*, 2005).

Los cruzamientos permiten establecer estrategias para desarrollar poblaciones sintéticas, que contengan la mejor combinación de genes de cada una de las poblaciones implicadas o para aprovechar los efectos genéticos no aditivos en sistemas de cruzamiento sintéticos (Falconer *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2005; Gjedrem, 2005).

Una manera de evaluar las cruzas con el que se obtienen las mejores combinaciones, es a través de un diseño de cruzamiento dialélico completo. Un ejemplo de este diseño en la acuicultura es el trabajo realizado por Bentsen *et al.*, en 1998, con 8 líneas de tilapia (*Oreochromis niloticus*), cuatro de origen silvestre y cuatro cultivadas, en el cual encontraron 4.3% de heterosis para características de crecimiento; Al igual que en usando 4 líneas de tilapias (*Oreochromis shiranus*), con una heterosis total 15.3% para peso (Maluwa y Gjerde, 2006); un estudio en con tres variedades de carpas (*Cyprinus carpio*), se observó que los cruzamientos que provenían de la variedad wuyuanensis, tenían los mejores rendimientos para el ancho del cuerpo con respecto a las otras variedades (Wang y Li, 2007).

Mientras que en otras especies acuícolas, se han encontrado resultados similares como en el caso del camarón (*Litopenaeus stylirostris*), en un cruzamiento entre dos líneas genéticas, encontraron tasas de crecimiento de 37% superior a las poblaciones puras, concluyeron que combinando los resultados de crecimiento y las tasas de supervivencia la producción de biomasa era mayor en las poblaciones híbridas con respecto a las puras (Goyard *et al.*, 2008)

Bartley *et al.*, en el (2001), realizaron una revisión de experimentos para obtener híbridos de diferentes especies de peces y observaron que en general, en bagres, salmones y tilapias, se obtienen híbridos fértiles, con características deseables de crecimiento y rendimiento de filete, mostrando valores favorables de heterosis, mientras que algunas especies de peces marinos en donde comienzan la producción en criaderos, como *Epinephelus fuscoguttatus*, y *E. polyphkadion*, los híbridos representan una alternativa para la producción porque se obtiene mejores rendimientos en características de crecimiento (Bartley *et al.*, 2001; Verdegem *et al.*, 1997; Scheerer *et al.*, 1983).

Variación genética

La variación o diversidad genética se puede definir como la cantidad de alelos y genotipos diferentes presentes en un grupo bajo estudio, ya sea especies o poblaciones dentro de una especie. Esta variación genética es originada por la recombinación y mutación, al igual que por la deriva génica y la selección natural, produciendo cambios los cuales permiten la evolución de las especies (Frankham et al., 2002; Eguiarte et al., 2009).

La variación puede reducirse cuando se utilizan pocos individuos como reproductores en una población. Esto genera deriva génica y un incremento de la consanguinidad en la población, aumentando la homocigosis y generando una reducción en la diversidad genética (Falconer et al., 2000; Frankham et al., 2002; Eguiarte et al., 2009).

Para estudiar la variación genética, se han utilizado diferentes marcadores moleculares como las isoenzimas, los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), los polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD y AFLP), los microsatélites y las secuencias de ADN.

Para obtener las secuencias de ADN, también se ha utilizado material genético que se encuentra en el citoplasma llamado ADN extranuclear, como es el caso del ADN mitocondrial (ADNmt) el cual está presente en todas las células eucariotas. El ADNmt se caracteriza por ser una molécula doble circular cerrada, de herencia materna, pues la recibe la cría en el óvulo, y no presenta

recombinación, a diferencia del ADN nuclear. El ADNmt varía de tamaño de 16 a 20 kb, lo cual representa menos del 1% del DNA total en vertebrados; está conformada por 37 genes (13 ARN mensajero, 2 ARN ribosomal y 22 ARN de transferencia). El ADNmt es considerado altamente polimórfico, ya que presenta una alta tasa de sustitución a nivel de secuencias de nucleótidos, por lo tanto tiene una gran diversidad (Gardner *et al.*, 2007; Eguiarte *et al.*, 2009). Por estas características, el ADNmt, es considerado como una excelente herramienta para estudios relacionados con filogenia, filogeografía y genética de poblaciones (Gardner *et al.*, 2007; Eguiarte *et al.*, 2009; FAO, 2010). Uno de los genes mitocondriales más empleados para estudios de estimación de la diversidad genética en las poblaciones, filogenia, filogeografía y pero principalmente para la Identificación de especies, ha sido el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) empleado en diferentes 7 diferentes Filum del reino animal (Hebert, 2003; Hebert *et al.*, 2003).

Estudios sobre variación genética e identificación de especies del género *Chirostoma*

Uno de los primeros estudios que se realizó para identificación de especies de género *Chirostoma*, fue realizado por Alaye en 1996a, quien trabajó con el polimorfismo de la hemoglobina y de acuerdo a los patrones de electroforesis, confirmó la presencia de la especie alopátrica *Chirostoma lucius* (Chapala) en el lago de Pátzcuaro. Sin embargo, estudios basados en caracteres alozimáticos mostraron que podría haber diversificación entre los miembros del género (Barriga-Sosa, 2001). En estudios más recientes basados en el ADN y realizado con marcadores genéticos, (Pérez, 2005) determinó la variación genética del gen mitocondrial para el ARN ribosomal 16S, en especies del género *Chirostoma*, y se encontró la existencia de haplotipos exclusivos para las especies silvestres *C. sphyraena* de Chapala y *C. estor* de Pátzcuaro; sin embargo, la población cultivada no pudo ser evaluada. Se comparó la variación genética con los

parámetros de diversidad nucleotídica (P_i) dentro del género (intraespecífica) en *Chirostoma* $P_i=0.38$ y entre especies (interespecífica) *C. estor* silvestre (0.39) y cultivada (0.16), con un índice de fijación $F_{ST}= 0.22$; $P<0.001$ (Barriga-Sosa 2001), se menciona la probabilidad de hibridación entre especies congéneres. Esta posibilidad la reportó Alaye en 1996b, cuando mencionó que se podría estar propiciando hibridaciones en el lago de Pátzcuaro, por malas prácticas de manejo al desovar reproductores *Chirostoma*, sin una identificación previa de las especies, con la idea de repoblar el lago. Sin embargo, tampoco se descarta la idea, de que pudieron haber ocurrido hibridaciones de forma natural entre las especies congéneres en el lago. (Alaye 1996b; Barriga-Sosa 2001; Rojas 2005).

III. Objetivos

General

Estimar curvas de crecimiento, heterosis y niveles de diversidad genética a partir de poblaciones de *Chirostoma estor* y *Chirostoma promelas* y sus híbridos recíprocos en cautiverio.

Particulares

- Estimar los parámetros de la curva de crecimiento para el peso y la longitud en dos especies de pez blanco *Chirostoma estor*, *Chirostoma. promelas* y sus híbridos, desde la eclosión hasta los 300 días de edad.
- Estimar efectos genéticos en el peso a través de un cruzamiento dialélico completo entre especies de pez blanco *Chirostoma estor* y *Chirostoma promelas*.
- Estimar la diversidad genética en dos especies de pez blanco *Chirostoma estor* y *Chirostoma promelas*, con el gen mitocondrial del citocromo oxidasa subunidad I COI.

IV. REFERENCIAS GENERALES

- Aguilar C, Friedli C, Cañas R. 1983. The growth curve of animals. *Agric S* 10: 133-147.
- Agudelo GDA, Cerón MF, Restrepo LLF. 2007. Modelación de funciones de crecimiento aplicadas a la producción animal. *Rev Col Cienc Pec* 20:157-173.
- Alaye RN 1993. El pescado blanco (Género *Chirostoma*) del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. INP. SEMARNAP. *Cienc Pesq* 9: 113-128.
- Alaye RN 1996a. Estudios del polimorfismo de la hemoglobina para identificar especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. INP. SEMARNAP. *Cienc Pesq* 13: 1-9.
- Alaye RN 1996b. Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. INP. SEMARNAP. *Cienc Pesq* 13: 10-17.
- Barbour DC. 1973. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces:Atherinidae): A species flock from the mexican plateau. *Copeia* 3: 533-566
- Barriga-Sosa IDLA. 2001. Variabilidad mormométrica, merística y molecular de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae). Tesis Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México. D.F. 199 pp.
- Barriga-Sosa IDLA Ibáñez-Aguirre AL y Arredondo-Figueroa JL. 2002. Morphological and genetic variation in seven species of the endangered *Chirostoma "humboldtianum" species group*(Atheriniformes: Atherinopsidae). *Rev Biol Trop* 50(1): 199-216.
- Barriga-Sosa IDLA. 2003. La importancia de los estudios de genética molecular en el género *Chirostoma*. *ContactoS* 47: 5-11.

- Barriga-Sosa IDLA, Pérez-Ramírez M, Soto-Aguirre F, Castillo-Rivera M, Arredondo-Figueroa JL. 2005. Inter-specific variation of the mitochondrial r16S gene among silversides, *Peces Blancos* (Atherinopsidae: Menidiinae) and its utilization for species identification. *Aquaculture* 250: 637-651.
- Bartley, DM, K. Rana, and AJ Immink. 2001. The use of Inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev Fish Biol Fisheries* 10: 325-337.
- Bentsen HB, Eknath AE, Palade-de Vera MS, Danting JC, Bolivar HL, Reyes RA, Dionisio EE, Longalong FL, Circa AV, Tayamen MM and Gjerde B 1998. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 160:145-173.
- Bloom DD, Piller KR, Lyons J, Mercado-Silva N and Medina-Nava M. 2009. Systematics and biogeography of the silverside tribe Menidiini (Teleostomi:Atherinopsidae) based on the mitochondrial ND2 gene. *Copeia* 2:408-417
- Brown JE, Fitzhugh HA, Cartwright TC. 1976. A comparison of nonlinear models for describing weight-age relationships in cattle. *J Anim Sci* (42):810-818.
- Csirke J. 1980. Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. FAO, Doc Téc Pesca (192):82 p.
- Delgadillo CAC, Lopez OR, Montaldo VHH, Luna EA, Shimada MA, Vásquez PCG. 2009. Caracterización de la curva de crecimiento del ciervo rojo (*Cervus elaphus scoticus*) en el centro de México. *Tec Pecu Mex* 47(1) 117-123.
- Domínguez-Domínguez O y Pérez-Ponce de León G. 2009. ¿La mesa central de México es una provincia biogeográfica? Análisis descriptivo basado en

componentes bióticos dulceacuícolas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80:835-852.

Echelle AA. and Echelle AF. 1984. Evolutionary Genetics of a "Species Flock:" Atherinid Fishes on the Mesa Central of Mexico, p. 93-110. *In: A A Echelle and I. Kornfield (eds.). Evolution of Fish Species Flocks.* Univ. Maine, Orono.

Eguiarte E.L., Souza V. y Aguirre X. 2007. *Ecología Molecular.* INE-SEMARNAT, UNAM y CONABIO. México, D.F. 592 pp.

Eknath AE, Bentsen HB, Gjerde B, Tayamen MM, Abella TA, Gjedrem T, and Pullin RSV. 1991. Approches to National Fish breeding programs: pointers from a Tilapia pilot study. *NAGA, the ICLARM Quarterly* 14 (2): 10-12.

Evans DH y Claiborne JB 2006. *The physiology of fishes.* Ed. Taylor & Francis. Florida 601 pp.

Falconer DS y Mackay FCT. 2000. *Introducción a la genética cuantitativa.* Ed. Acribia. España. 469 pp.

FAO, Inf. Pesca, 1974. *Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina.* Volumen 1 - documentos de investigación. Montevideo, Uruguay, 26 de noviembre a 2 de diciembre de 1974 *Conferences - Montevideo (Uruguay).* Experience papers. *Aquaculture. Aquaculture development. Latin America.* 159:Vol.1:374 p.

FAO. 2010. *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura,* editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>) (traducción de la versión original en inglés, 2007).

FAO. 2010. *Estado mundial de la pesca y la acuicultura.* 219 pp.

- Figuerola LG, Maya JP y Hernández RMC. 2003. Retrospectiva y avances en el conocimiento de la biología y ecología de los charales y peces blancos del género *Chirostoma* (*Atheriniformes:Atherinopsidae*) En: Historia y avances del cultivo de pescado blanco. P29-48. Ed: Patricia Rojas Carrillo. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca. México. ISBN 968-800-540-1. 290pp.
- Fitzhugh HA. 1976. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. *J Anim Sci* (42):1036-1051.
- Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press. 617 pp.
- Gardner EJ, Simmons y Snutad. 2007. Principios de Genética. Limusa-Wiley. México D.F. 713 pp.
- Gjedrem T. Ed. 2005. Selection and breeding programs in aquaculture. Springer, Dordrecht. 364 pp.
- Goyard E, Goarant C, Ansquer D, Brun P, Decker S, Dufour R, Galinié C, Peignon JM, Pham D, Vourey E, Harache Y, Patrois J. 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *stylirostris*. *Aquaculture* 278: 43-50.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and Waard JR. 2003. Biological Identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313-322.
- Hebert PDN, Ratnasingham S Waard JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B (Suppl.)* 270: S96-S99.

- Hopkins KD. 1992. Reporting fish growth: A review of the basics. *World Aquaculture Soc* 23: 173-179.
- Jones RE, Pretell RJ, Pauly D. 1999. Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish. *Aquac Eng* 20:261–276.
- López S, France J, Gerrits WJJ, Dhanoa MS, Humphries DJ, Dijkstra J. 2000 A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *J Anim Sci* (78):1816-1828
- Martínez PCA, Barriga TE, Taylor JF, Rios GD and Ross LG. 2002. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209. 369-377.
- Martínez-Palacios CA, Ríos Duran Ma G, Campos Mendoza A, Toledo Cuevas M, Aguilar Valdez Ma de C and Ross LG. 2003. Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. En: Historia y avances del cultivo de pescado blanco. p169-190. Ed: Patricia Rojas Carrillo. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca. México. ISBN 968-800-540-1. 290pp.
- Maluwa AO and Gjerde B. 2006. Genetic evaluation of four strains of *Oreochromis shiranus* for harvest body weight in a diallel cross. *Aquaculture* 259:28-37
- Miller RR 2005. Freshwater fishes of México. The University of Chicago press. Ltd., London. 490 pp.
- Moncayo, ER, Escalera GC and Segura GV. 2003. Los peces blancos del lago de Chapala Características generales. In. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. ed. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca, México. 51-78.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-032-PESC-2003, Pesca responsable en el lago de Chapala ubicado en los estados de Jalisco y Michoacán, especificaciones para el aprovechamiento de los recursos pesquero.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-ECOL-1994. Que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazada, raras y las sujetas a protección especial y que establecen especificaciones para su protección.

Pérez RMY. 2005. Discriminación morfológica, molecular y determinación de la variación genética de peces blancos (Atherinopsidae: *Chirostoma*).. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Tesis de maestría.

Rahman MA, Uehara T, and Lawrence MJ. 2005. Growth and heterosis of hybrids of two closely related species of Pacific sea urchins (Genus *Echinometra*) in Okinawa. *Aquaculture* 245: 121– 133.

Ricker WE. Computation and interpretation of biological statistics of fish population. Department of the environment fisheries and Marine Service. Ottawa: 1975. 382p.

Rojas CPM y Sasso YLF. El pescado blanco. *Revista digital universitaria*. 2005; 6: 1-18. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num8/art80/art80.htm>

Rojas CPM. 2003a. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. p169-190. Ed: Patricia Rojas Carrillo. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca. México. ISBN 968-800-540-1. 290pp.

Rojas CPM. 2003b. Cultivo de pescado blanco del lago de Pátzcuaro. Una revisión de las investigaciones del Instituto Nacional de la Pesca. En: Historia y avances del cultivo de pescado blanco. p15-28. Ed: Patricia Rojas Carrillo. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca. México. ISBN 968-800-540-1

- Salazar G, Graziani C, Villarroel E, Luna M, Moreno C y Guevara M. 2005. Híbridación entre los camarones de río *Macrobrachium rosenbergii* (de man) *M. acanthurus* (Wiegman). ¿Es posible?. *Interciencia*. 30:501-505
- Santos MN, Gaspar MB, Vasconcelos P, Monteiro CC. 2002. Weight-length relationships for 50 selected fish species of the Algarve coast (Southern Portugal). *Fish Res* 59:289-295
- Scheerer PD and Thorgaard GH. 1983. Increased survival in salmonid hybrids in induced triploidy. *Can J Fish Aquat Sci* 40: 2040-2044.
- Stufflebeam, CE. 1989. *Genetics of domestic animals*. Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 295 pp.
- Tave DR, Smitherman RO and Jayaprakas. 1989. Estimate of additive genetic effects, maternal effects, specific combining ability, maternal heterosis, and egg cytoplasm effects for cold tolerance I *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquacult fish Manage* 20: 159-166
- Van Vleck LD, Pollak EJ and Bradford Oltenacu EA. *Genetics for the Animal Science*. W.H. Freeman and Company, New York. 1987. 291 pp
- Verdegem MCJ, Hilbrands AD and Boon JH. 1997. Influence o salinity and dietary composition on blood parameter values of Irbid red tilapia, *Oreocromis niloticus* x *O. mossambicus*. *Aquacult Res* 28: 453-459
- Wang CH and Li SF. 2007. Genetic effects and genotypexenvironment interactions for growth-related traits in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 272: 267-272.
- Warwick EJ and Legates JE. 1992. *Cría y Mejora del Ganado*. Ed. Interamericana Mcgraw-Hill, México. 344 pp.

V. CARACTERIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA DOS ESPECIES DE PEZ BLANCO *Chirostoma estor*, *C. promelas* Y SUS HÍBRIDOS

Ana Carmen Delgadillo-Calvillo*, Carlos Antonio Martínez-Palacios**, José Manuel Berruecos-Villalobos*, Raúl Ulloa-Arvizu*, Reyes López-Ordaz* y Carlos Gustavo Vásquez-Peláez*.

* Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

** Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. San Juanito Itzícuaró s/n, Col. San Juanito Itzícuaró, Morelia, Michoacán, México. C.P. 58337.

Correspondencia: E-mail: carlosgv@servidor.unam.mx

Este trabajo es parte de la tesis doctoral del primer autor.

En proceso de publicación en la revista Veterinaria México.

CARACTERIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO EN DOS ESPECIES DE PEZ BLANCO *Chirostoma estor*, *C. promelas* Y SUS HÍBRIDOS

Resumen

El objetivo del presente estudio fue estimar parámetros de las curvas de crecimiento del peso y la longitud en el pez blanco *Chirostoma estor* (EE), el pez blanco pico negro *Chirostoma promelas* (PP) y de sus híbridos recíprocos (EP y PE) hasta los 300 días de edad a partir de un cruzamiento dialélico completo bajo condiciones de cultivo en Morelia Michoacán, México. La longitud se midió mensualmente desde la eclosión, mientras que el peso se midió mensualmente a partir de los 120 días; Los números totales observaciones (muestras) analizadas para longitud fueron 1006 (26), 771 (22), 513 (22) y 421 (21) para los grupos EP, PE, PP y EE, respectivamente. Los números totales de observaciones (muestras) analizadas para peso fueron 630 (16), 521 (14), 263 (13) y 256 (13) para los grupos EP, PE, PP y EE, respectivamente. Las curvas de crecimiento para peso y longitud se estimaron con modelos de regresión no lineal. El grupo EE alcanzó un peso estimado de 7.89 g a los 300 días de edad, 65% mayor que el de PP (4.78 g) y 57% mayor que el promedio de los híbridos ($P < 0.01$) EE tuvo una longitud de 9.31 cm (14%) mayor que PP (7.97 cm) y 13% mayor que la del promedio de los híbridos ($P < 0.01$). Los cuatro grupos, mostraron un crecimiento de tipo alométrico positivo con valores de 3.2 a 3.3 ($P < 0.05$). Los resultados de este estudio son las primeras estimaciones comparativas de las características de crecimiento hasta los 300 días de edad para estas especies y sus híbridos en cautiverio.

Palabras clave: COEFICIENTE DE ALOMETRIA, *Chirostoma estor*, *C. promelas*, CURVAS DE CRECIMIENTO.

CHARACTERIZATION OF THE GROWTH CURVE IN TWO SPECIES OF SILVERSIDES *Chirostoma estor*, *C. promelas* AND THEIR HYBRIDS

Abstract

The objective of the present study was to estimate parameters of growth curves of the weight and the length in silversides *Chirostoma estor* (EE), the silversides *Chirostoma promelas* (PP) and their reciprocal hybrids (EP and PE) to 300 days of age from a complete diallel cross under culture conditions in Morelia Michoacán, México.

The length was measured monthly from hatching, while the weight was measured monthly from the 120 days; The total number of observations (samples) were analyzed for length 1006 (26), 771 (22), 513 (22) and 421 (21) for groups EP, PE, PP and EE, respectively. Total number of observations (samples) were analyzed for weight 630 (16), 521 (14), 263 (13) and 256 (13) for groups EP, PE, PP and EE, respectively. The growth curves for weight and length were estimated using nonlinear regression models. The group EE reached a weight estimated 7.89 g at 300 days of age, 65% higher than the PP (4.78 g) and 57 % higher than average their hybrids ($P<0.01$) EE had a length of 9.31 cm (14%) larger than PP (7.97 cm) and 13% larger than average their hybrids ($P<0.01$). The four groups showed a positive allometric growth with values of 3.20 to 3.3 ($P<0.05$). The results of this study are the first comparative estimates of growth characteristics to 300 days of age for these species and their hybrids in captivity.

Keywords: ALLOMETRIC COEFFICIENT, *Chirostoma estor*, *C. promelas*, GROWTH CURVE.

Introducción

El pez blanco *Chirostoma estor* y el llamado pico negro *Chirostoma promelas*, pertenecen a la familia de *Atherinopsidae* de origen marino.^{1,2} Ambas especies son consideradas nativas de los lagos de Pátzcuaro en Michoacán y Chapala en Jalisco, respectivamente, los cuales se encuentran localizados en la Mesa Central de México.²

Estas especies de peces blancos son consideradas de gran importancia económica y cultural para las localidades de origen,¹ por la gran demanda que presentan en los mercados regionales, pero la pesca indiscriminada de peces de todas las tallas, incluyendo aquellas que alcanzan la edad reproductiva, ha provocado una disminución en las poblaciones, lo que generó el interés para desarrollar cultivos con el fin de conservarlas y estudiarlas.^{3,4}

En estudios previos se menciona que la edad a la madurez sexual en estas especies es en promedio al año de edad con una longitud de 12 cm, y que la talla comercial (20 cm) se alcanza a los dos años,^{1,3} razón por la cual son consideradas de lento crecimiento, sin embargo, no se ha evaluado, ni comparado el crecimiento de estas especies, ni de sus híbridos durante la etapa juvenil ni hasta al año de edad, lo que resulta importante para conocer la biología y las características de crecimiento que presentan estas especie en condiciones de cultivo.

La caracterización del crecimiento en los peces se ha realizado a través de medidas de peso y longitud^{5,6} y de la relación peso-longitud, mediante el coeficiente de alometría,⁷ para lo cual se han utilizado modelos no lineales.⁶ La estimación de los coeficientes de alometría permite evaluar la relación entre la evolución de la longitud y el peso en los peces, lo que permite determinar el tipo

de crecimiento, lo que es importante porque se puede utilizar como un índice práctico para evaluar la condición de los peces, la cual depende de varios factores tales como la disponibilidad de alimento, el estado de salud de los peces, el sexo, desarrollo de gónadas y el periodo de desoves.^{8,9} Sin embargo, esta relación peso longitud, también permite hacer comparaciones morfométricas entre y dentro de las poblaciones, así como evaluar la biomasa y la dinámica de las poblaciones utilizada en pesquerías.¹⁰

Considerando lo anterior, el objetivo de presente estudio fue estimar los parámetros de las curvas de crecimiento del peso y la longitud en estas especies y de sus híbridos, hasta los 300 días de edad en cultivo, así como establecer si el crecimiento de estos grupos es alométrico o isométrico.

Material y métodos

Población base

A partir de 1999, se han mantenido en cultivo una población de *C. estor* y una de *C. promelas*, en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicholas de Hidalgo (IIAF-UMSNH) en Morelia Michoacán, México. Las poblaciones se establecieron a partir de muestreos realizados en los lagos de Pátzcuaro y Chapala desde 1999 hasta el 2001. En los muestreos se capturaron aquellos peces con una longitud superior a los 15 cm, los cuales fueron desovados y fertilizados *in situ*, para posteriormente incubar los huevos fecundados bajo condiciones de cultivo. Estas poblaciones han permanecido cerradas con apareamientos aleatorios dentro de especie desde el 2001

Diseño de apareamientos

El experimento se realizó en el año 2008, utilizando reproductores de 3 a 4 años de edad, de las dos poblaciones ya descritas, para realizar un cruzamiento dialélico completo con una relación 2♂:1♀ utilizando 110 ♂ y 55 ♀, para producir cada grupo genético; ♂*C. promelas* x ♀*C. promelas* (PP), ♂*C. estor* x ♀*C. promelas* (EP), ♂*C. promelas* x ♀*C. estor* (PE) y ♂*C. estor* x ♀*C. estor* (EE). Los reproductores fueron sometidos a un programa de control del fotoperiodo (incremento de horas luz desde 12 horas de luz: 12 de oscuridad, hasta alcanzar 16 horas de luz: 8 de oscuridad), con el objeto de prolongar la época de desove.

Manejo y alimentación

Desde la eclosión y hasta los 30 días de edad, las larvas se mantuvieron en tinas de 15 L de capacidad con una salinidad de 5 a 10 g/L y una temperatura de 21°C a 23°C. De la eclosión hasta los 5 días de edad, las larvas fueron alimentadas con neonato de rotífero de *Brachionus plicátillis* (70-100 µ); de los 6 a 15 días de edad, con rotífero adulto (100-160 µ) y de los 16 a 30 días de edad con nauplios de *Artemia franciscana*. A partir de los 30 días y hasta los ocho meses de edad, los peces fueron alimentados ad libitum con una mezcla comercial * en hojuela básica para peces de agua dulce con 42% de proteína, cuatro veces al día y una vez al día, con alimento vivo (*nauplios de Artemia franciscana*); A partir de esta edad, se alojaron en tanques (3m de largo), con una capacidad de 180 L de agua dulce, en un sistema de recirculación. En la etapa final, de los ocho y hasta los 10 meses de edad, los peces se alojaron en estanques de 1.5 m de diámetro por 1 m de altura, con una temperatura promedio de 25°C, con una alimentación similar a la descrita para el periodo anterior.

* Azoo ® (Azoo México S.A. de C.V. Circuito el Marqués sur No.17, Parque Industrial el Marqués, C.P. 76246, Querétaro México)

Datos

Las larvas se separaron en tres réplicas de acuerdo a la fecha de eclosión (mayo-junio, julio-septiembre y octubre-noviembre). Las mediciones se realizaron mensualmente en muestras obtenidas al azar de cada réplica, la longitud se midió desde la eclosión y hasta los 90 días de edad tomando una fotografía de un grupo de larvas en una caja Petri, con papel milimétrico en el fondo; a partir de los 120 y hasta los 300 días de edad, los peces fueron sedados utilizando benzocaína (50 mg/L) con una dosis de 5 ml/L durante cinco minutos, la longitud se midió individualmente con la ayuda de un ictiómetro, mientras que el peso (g) se obtuvo con una balanza granataria, el número total de observaciones (muestras) para longitud fueron 1006 (26), 771 (22), 513 (22) y 421 (21), mientras que para el peso fueron 630 (16), 521 (14), 263 (13) y 256 (13), para los grupos EP, PE, PP y EE, respectivamente. El sexo de los peces no pudo ser determinado, debido a que estas especies no presentan dimorfismo sexual antes de la madurez, la que se alcanza después de un año de edad.

Análisis Estadísticos

Curvas de crecimiento

Se estimaron los parámetros de un modelo de curva de crecimiento del peso definido como $P_t = ae^{bt}$,¹¹ donde P_t es el peso del pez a la edad t ; a es el origen; e es la base de los logaritmos naturales; b es la pendiente o cambio de peso por unidad de tiempo (t). El modelo utilizado para estimar los parámetros para la longitud fue: $L_t = k / (1 + ((k - n_0) / n_0) e^{-rt})$,¹² donde L_t es longitud total a la edad (t), n_0 es el valor esperado de longitud a la eclosión ($t=0$); k es el valor estimado de la longitud a la edad adulta; r es el cambio en longitud por unidad de tiempo (t) y e es la base de los logaritmos naturales.

La relación peso-longitud se estimó mediante la función alométrica $P=aL^b$,^{6,7, 13-15} donde P es el peso g y L la longitud en cm del pez, respectivamente; a es el origen de la función o factor de condición y b es el coeficiente de alometría, que es un indicador del tipo de crecimiento que exhibe una especie.⁷ El número de pares de observaciones para peso-longitud fueron 630, 521, 263 y 256 para los grupos EP, PE, PP y EE, respectivamente.

Un crecimiento de tipo isométrico se puede definir, cuando dos características como peso y longitud, crecen en la misma proporción con el tiempo. En peces se ha encontrado que el volumen o masa total del cuerpo es directamente proporcional al cubo de su longitud ($b=3$), el que representa un crecimiento isométrico, por lo tanto, si $b>3$ el crecimiento es alométrico positivo, y será alométrico negativo si $b<3$.^{5,7,9,16} Para determinar el tipo de crecimiento, se utilizó una prueba de t .^{9,13} ($H_0: b=3$) con un nivel de confianza ($\alpha=0.05$).

Para determinar si existían diferencias entre los grupos a los 300 días de edad, se utilizó un modelo lineal como el siguiente $y_{ijk} = \mu + R_i + G_j + e_{ijk}$ donde: y_{ijk} son las observaciones de las variables de respuesta (peso y longitud observados y estimados con las ecuaciones, a los 300 días de edad, así como los estimados de los parámetros b y r), μ es la media de la población, R_i es el efecto fijo de la i -ésima réplica, G_j es el efecto fijo del j -ésimo grupo y e_{ijk} es el error. Se realizaron comparaciones múltiples de medias entre grupos con una prueba de Tukey.¹⁷

Los modelos fueron analizados con los procedimientos NLIN y GLM implementados en el programa estadístico SAS.¹⁸

Resultados

En el cuadro 1 se muestran los estimados de los parámetros b y r , pesos (g) y longitudes (cm) observadas y estimadas con los modelos a los 300 días de edad para las especies *C. estor*, *C. promelas* y sus híbridos recíprocos.

La función de crecimiento del peso explicó una proporción de varianza desde 0.86 para EP hasta 0.93 para EE. *C. estor* alcanzó un peso de 7.89 g a los 300 días de edad, el que es 65% mayor ($P < 0.01$) que el de *C. promelas* (4.78g) y 57% mayor que del promedio de los híbridos. *C. promelas* presentó un peso semejante al de los híbridos ($P > 0.05$). En la Figura 1 se muestran las curvas de crecimiento para *C. estor*, *C. promelas* y sus híbridos. Se observa que EE tiene pesos superiores a los de los otros grupos, siendo estas diferencias crecientes a partir de los 210 días de edad.

Para la longitud predicha, la función evaluada explicó 0.98 de la variación total en todos los grupos. La longitud de *C. estor* fue 9.31 cm a los 300 días de edad, es un 14% mayor ($P < 0.01$) que *C. promelas* (7.97 cm) y 13% más largo que el de los híbridos ($P < 0.01$), siendo estos tres últimos grupos semejantes ($P > 0.05$). En la Figura 2, se muestra la evolución de la longitud en los cuatro grupos estudiados. La diferencia de talla a los 210 días de edad, entre el grupo EE y los otros grupos va de 0.40 a 0.65 cm y permanece constante a través de tiempo, con excepción de aquella para el grupo PP que a los 300 días de edad alcanza un valor de 1.1 cm. Desde los 210 días de edad *C. estor*, presentó una longitud promedio 8.43% mayor al resto de los grupos.

Las ecuaciones de la relación de peso-longitud fueron $P = 0.00413 L^{3.20}$, $P = 0.004 L^{3.25}$, $P = 0.00396 L^{3.25}$ y $P = 0.00352 L^{3.31}$, para EP, PE, PP y EE, respectivamente con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.98, para los cuatro grupos, mostrando valores para el coeficiente de alometría (b) significativamente mayores

a 3 con valores de 3.20 ($t= 10$, $P<0.05$), 3.25 ($t= 12$, $P<0.05$), 3.25 ($t= 12.5$, $P<0.05$) y 3.31 ($t= 10.33$, $P<0.05$), para los grupos EP, PE, PP y EE, respectivamente, lo que indica un tipo de crecimiento alométrico positivo en los cuatro grupos estudiados.

Discusión

La longitud de los cuatro grupos fue similar durante los primeros 90 días de edad, resultados que son semejante a lo encontrado por Martínez *et al.*,^{3,19} quienes estimaron el crecimiento de *C. estor* con diferentes niveles de salinidad, encontrando que la talla fue de 1.7 cm a los 30 días de edad para concentraciones de 0 a 5 g/L, mientras que a salinidades de 10 a 15 g/L la longitud fue 2 cm, lo cual podría deberse al origen marino de esta especie (Barbour, 1973)².

Sin embargo, en el presente estudio se observó que a partir de los 210 y hasta los 300 días de edad, el grupo EE, presentó un mayor incremento en peso y talla con respecto al grupo PP y a sus híbridos. Se observó además que los grupos que provenían de madres *C. estor* (PE y EE), presentaban en general un crecimiento superior en comparación a los grupos EP y PP, por lo que se considera entonces que existe un posible efecto materno favorable de la especie *C. estor* en las características estudiadas.

El parámetro de alometría (b) estimado a partir de la relación peso-longitud, tuvo valores de 3.20 a 3.31 indicando un tipo de crecimiento alométrico positivo, es decir, un crecimiento desproporcionado entre peso y longitud, por lo tanto indican que la tasa de incremento en peso es mayor que el de la longitud, estos resultados fueron similares a los estimados en otras especies de la misma familia *Atherinopsidae*. Martínez *et al.*, (2002)²⁰ estimó un coeficiente de alometría de

3.32, a través del peso seco medido en larvas de 30 días de edad. Resultados semejantes a los de este estudio han sido encontrados en *Chirostoma humboltianum* con un valor de $3.10^{21, 22}$ para el pejerrey argentino (*Odontesthes bonariensis*) con un valor de 3.12^{23} . El hecho de que estas especies presenten un crecimiento alométrico positivo, podría indicar una buena condición de estos peces, determinada por las condiciones de cultivo que resultó favorables. ^{8,9,16}

Estas estimaciones de curvas de crecimiento para peso y longitud en estas especies y sus híbridos en cultivo, hasta los 300 días de edad son las primeras para estos grupos genéticos. El caracterizar la evolución de la longitud y el crecimiento en estos peces es importante para conocer la biología y el comportamiento que presentan estas especies en condiciones de cultivo, por lo tanto, aporta elementos para desarrollar mejores programa de manejo y alimentación y en general para mejorar el cultivo de estas especies.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH) y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por las facilidades prestadas para realizar el experimento Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT- IN212508 (UNAM) y por CONACyT 080 420.

Referencias

1. ROJAS CPM, SASSO YLF. El pescado blanco. Revista digital universitaria. [serial online 2005 Aug 10] [cited 2010 Aug 9]. Available from: URL <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num8/art80/art80.htm>
2. BARBOUR DC. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces:Atherinidae): A species flock from the mexican plateau. Copeia 1973; 3: 533-566
3. MARTÍNEZ PCA, RÍOS DMG, CAMPOS MA, TOLEDO CM, AGUILAR VMC, ROSS LG. Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. En: ROJAS CP editora. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF: Sagarpa, Insituto Nacional de la Pesca. 2003:169-190.
4. MARTÍNEZ PCA, RÍOS DMG, CAMPOS MA, TOLEDO CM, ROSS LG. Avances en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del. Cancún, Quintana Roo, México. 2002: 336-351.
5. CSIRKE J. Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. FAO, Doc Téc Pesca, 1980;192:82.
6. HOPKINS KD. Reporting fish growth: A review of the basics. World Aquaculture Soc 1992; 23: 173-179.
7. RICKER WE. Computation and interpretation of biological statistics of fish population. Bull fish Res Bd Can 1975; 191:82.
8. LOPEZ CA, SIDERKEWICJ n. Age and growth of the largemouth perch *Percichthys colhuapiensis* in the Negro river, Argentine Patagonia. Fish Resh 2008; 92: 169-179.
9. SANTOS MN, GASPAR MB, VASCONCELOS P, MONTEIRO CC. Weight-length relationships for 50 selected fish species of the Algarve coast (Southern Portugal). Fish Res 2002; 59: 289-295.

10. RAMOS-CRUZ S. Relación longitud-peso y factor de condición en el barrilete negro *Euthynnus lineatus* (Kishinouye, 1920) (Perciformes: Scombridae), capturado en el litoral de Oaxaca, México. Rev Invest Mar 2009; 30(1):45-53.
11. ZARZA MEA, BERRUECOS VJM, VÁSQUEZ PCG, ÁLVAREZ TP. Cultivo experimental de Robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) y chucumite *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) (Perciformes:Centropomidae) en agua dulce en un estanque de concreto en Alvarado, Veracruz, México. Vet Méx 2006; 37: 327-333.
12. ZAMORA BG, VÁSQUEZ PCG, BERRUECOS VJM, SOTO RL. Estimación de algunos efectos genéticos de la trucha Arcoiris a partir de un cruzamiento dialélico completo de dos líneas. II. Crecimiento y producción. Vet Méx 1999; 30: 235-241.
13. INFANTE GS, ZÁRATE GP. Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. 2ª ed. México: Trillas, 1990: 643.
14. ANDRADE HA, CAMPOS RO. Allometry coefficient variations of the length–weight relationship of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) caught in the southwest South Atlantic. Fish Res 2002; 55: 307–312.
15. SANTOS MN, CANAS A, LINP PG, MONTEIRO CC. Length–girth relationships for 30 marine fish species. Fish Res 2006; 78: 368–373.
16. JONES RE, PRETELL RJ, PAULY D. Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish. Aquac Eng 1999; 20:261–276.
17. SAXTON MA. Genetic analysis of complex traits using SAS. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2004: 292.
18. SAS, SAS ISTAT user guide versión 8. SAS Institute cary, N.C. USA. 2001.
19. MARTÍNEZ PCA, RACOTTA IS, RÍOS-DURÁN MG, PALACIOS E, TOLEDO-CUEVAS, ROSS LG. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides. Biocell 2006; 30: 137-148.
20. MARTÍNEZ PCA, BARRIGA TE, TAYLOR JF, RÍOS DG, ROSS LG. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of

- length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 2002; 209: 369-377.
21. MERINO SR, DÍAZ ZM, NAVARRETE SNA, GARCÍA MML, AYALA NF, FLORES AMD. Crecimiento, mortalidad y sobrevivencia del charal *Chirostoma humboldtianum* (Atherinopsidae) en el embalse San Miguel Arco, Soyaniquilpan, Estado de México. *Revi Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente.* 2006; 12: 151-154.
22. FIGUEROA LG, GONZALEZ MO, HERNANDEZ RMC, BARRIGA SIA, RODRÍGUEZ CA, ARREDONDO FJL. Growth, survival and mandible development in the larvae of the shortfin silverside *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) (Atheriniformes:Atherinopsidae) under laboratory conditions. *Aquaculture* 2004; 242: 689-696.
23. ESPINACHI RA, DOMÁNICO A. Growth of argentine silverside (*Odontesthes bonariensis*) stocked low oligohaline shallow lakes (Buenos Aires province, Argentina). *Rev Invest Desarr Pesq.* 2006; 18:75-80

Cuadro 1

MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS PARA PESO (g) Y LONGITUD (cm) A LOS 300 DÍAS DE EDAD Y LOS PARÁMETROS ESTIMADOS PARA LAS FUNCIONES DE CRECIMIENTO DE PESO Y LONGITUD EN DOS ESPECIES DE PEZ BLANCO Y SUS HÍBRIDOS.

		<i>Peso=ae^{bt}</i>				<i>Peso a los 300 días</i>			
<i>Grupos genéticos</i>	<i>n</i>	<i>a ± e.e.</i>	<i>b ± e.e.</i>	<i>IC 95% de b</i>	<i>R²</i>	<i>estimado</i>	<i>n</i>	<i>Observado</i>	
EP	630	0.1338 ± 0.0137	0.0119 ± 0.0003 ^a	0.011 - 0.013	0.86	4.75	96	4.704 ± 0.081 ^b	
PE	521	0.1112 ± 0.0107	0.0129 ± 0.0003 ^a	0.012 - 0.014	0.90	5.33	66	5.073 ± 0.098 ^b	
PP	263	0.0636 ± 0.0106	0.0144 ± 0.0005 ^a	0.013 - 0.016	0.89	4.78	38	4.989 ± 0.133 ^b	
EE	256	0.1050 ± 0.0112	0.0144 ± 0.0004 ^a	0.014 - 0.015	0.93	7.89	17	7.495 ± 0.196 ^a	

		<i>Longitud= k/(1+((k-n₀)/n₀)e^{-rt})</i>				<i>Longitud a los 300 días</i>				
<i>Grupos genéticos</i>	<i>n</i>	<i>k ± e.e.</i>	<i>n₀ ± e.e.</i>	<i>r ± e.e.</i>	<i>IC 95% de r</i>	<i>R²</i>	<i>estimado</i>	<i>n</i>	<i>Observado</i>	
EP	1006	9.2448 ± 0.1532	1.2210 ± 0.0420	0.0137 ± 0.0004 ^a	0.013 - 0.015	0.98	8.34	96	8.861 ± 0.060 ^b	
PE	771	10.4259 ± 0.2743	1.3250 ± 0.0468	0.0117 ± 0.0004 ^a	0.011 - 0.013	0.98	8.65	66	8.954 ± 0.073 ^b	
PP	513	8.7843 ± 0.2017	1.1574 ± 0.0497	0.0139 ± 0.0005 ^a	0.013 - 0.015	0.98	7.97	38	8.862 ± 0.098 ^b	
EE	421	10.7513 ± 0.3238	1.2104 ± 0.0519	0.0131 ± 0.0005 ^a	0.012 - 0.014	0.98	9.31	17	10.067 ± 0.145 ^a	

n=Número de observaciones, e.e. error estándar, *I.C.* Intervalo de confianza, *a*= es el origen de la función ; *b*= ganancia de peso; *t*= es la edad en días, *k*= es el valor estimado de la longitud a una edad adulta; *n₀*=es el valor estimado de la longitud a la eclosión; *e*= es el número base de los logaritmos naturales; *r*=es la estimación de cambio por unidad de tiempo y *R²*= coeficiente determinación, ^{a,b} diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.01)

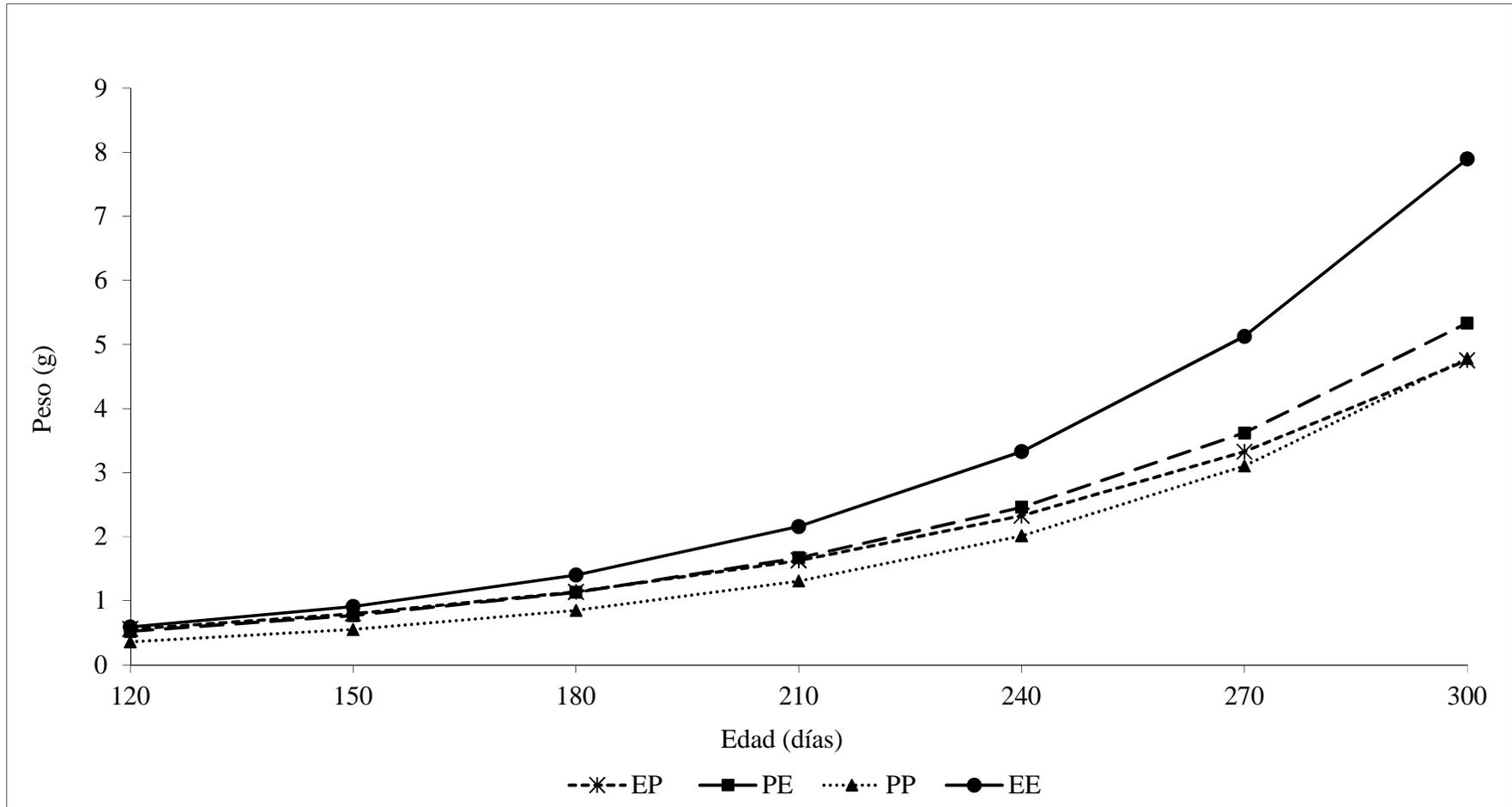


Figura 1. Curvas de crecimiento estimadas con funciones no lineales en *Chirostoma estor* (EE), *Chirostoma promelas* (PP) y sus híbridos recíprocos (EP y PE) desde los 120 a los 300 días de edad.

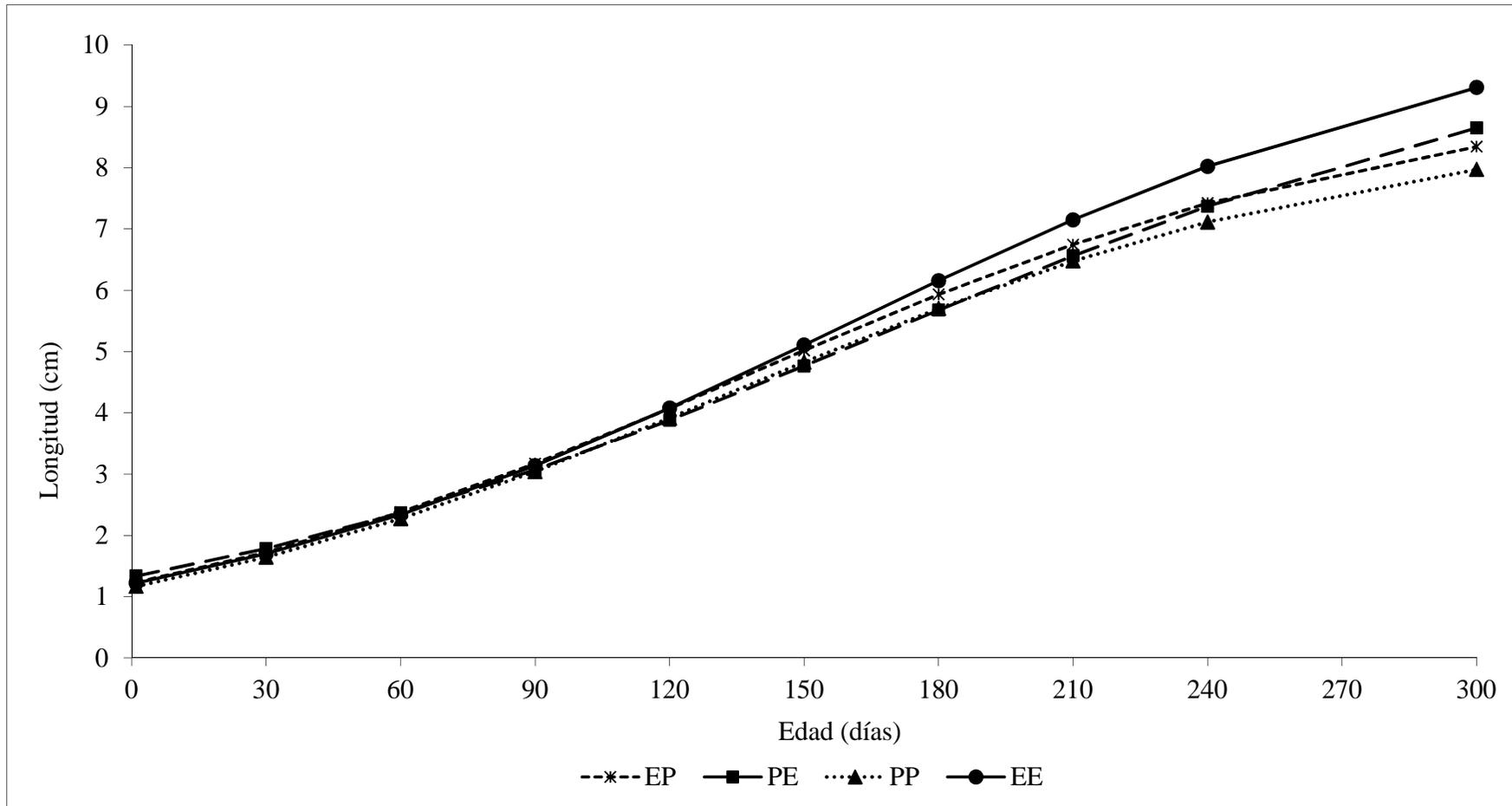


Figura 2. Curvas de crecimiento estimadas con funciones no lineales en *Chirostoma estor* (EE), *Chirostoma promelas* (PP) y sus híbridos recíprocos (EP y PE) desde la eclosión hasta los 300 días de edad.

VI. EFECTOS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO EN DOS ESPECIES DE PECES BLANCOS *Chirostoma estor* Y *Chirostoma promelas* BAJO UN DISEÑO DE CRUZAMIENTO DIALÉLICO.

GENETIC EFFECTS FOR GROWTH RATE IN TWO SILVERSIDES SPECIES *Chirostoma estor* AND *C. promelas* UNDER A DIALLEL CROSS DESIGNS

GENETIC EFFECTS FOR GROWTH RATE IN TWO SILVERSIDES SPECIES *Chirostoma estor* y *Chirostoma promelas* UNDER A DIALLEL CROSS DESIGNS

Abstract

The species of "peces blancos" *Chirostoma estor* and *C. promelas* are native to the lake of Pátzcuaro and Chapala, located in the Central Plateau of Mexico, these fish represent a fishery resource, so these species are considered of great economic and cultural importance to this region. However, due to overfishing and pollution the populations have declined. Moreover, these fish species are characterized as low growth rate, reaching market size at two years age, for these reasons the interest to maintain these populations in artificial culture in order to preserve and study. The aim of this study was to estimate the genetic additive and non additive effects between these two species under a complete diallel cross design. The progeny of each cross was measured monthly between 120 to 300 days of age. The results showed differences in weight between species at all ages, being *C. estor* 53% superior in average than *C. promelas*. On the other hand, heterosis was very inconsistent along the study. The results of this study are non conclusive to explain the additive or non additive effects in the cross between these two species.

Keywords: Diallelic cross, *Chirostoma estor*, *C. promelas*, Heterosis, Growth.

Introduction

Crossing designs have been widely used as a tool for genetic improvement to increase response in production traits or to develop synthetic breeds, lines or strains in domestic animals such as cattle, swine, poultry, rabbits, among others (Madalena, 2001; Mastache *et al.*, 2003; Nofal *et al.*, 2004 and Montesinos *et al.*, 2007). This practice has been extended to other commercial species in aquaculture such as oysters (Hedgecock and Davis, 2007), sea urchins (Rahman *et al.*, 2005), crustaceans (Brian *et al.*, 1994 and Thanh *et al.*, 2009), and in some species of fish (Kinghorn 1983; Tave *et al.*, 1989; Hulata 1995; Bartley *et al.*, 2001 and Gjedrem 2004).

There are different crossbreeding systems. However, the diallel cross design allows not only to estimate heterosis of the traits, but also to recognize those populations that should be used as paternal or maternal, to get a better response.

Gjerde and Refstie (1984) found 17.5% of heterosis for adult weight and a range (-0.22 to 0.30 kg) of specific heterosis for body weight estimated from a complete diallel crossing design of five lines of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Zamora *et al.*, (1999) determined an individual heterosis of 46.44%, and 26.8% of additive effect for weight gain in two lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*), Maluwa and Gjerde (2006), estimated 12.5% heterosis for weight gain and an additive effect of 10.3% to 16.9% using four lines of trout (*Labeo rohita*). However, other studies have shown low and negative heterosis, as Gjerde *et al.*, (2002) who observed values between -31.8 to -6.4 for weight and 0 to 5.9% for survival using one cultured and four wild populations of carp (*Labeo rohita*).

In Mexico, the freshwater silversides of the family Atherinopsidae, genus *Chirostoma* belongs to the group Jordani or large size, which are endemic and is distributed mainly between Lake Pátzcuaro and Chapala in the states of Michoacán and Jalisco (Moncayo *et al.*, 2003) are economically important to this

region. Some species of genus *Chirostoma* has slow growth reaching commercial size (20 cm) in 24 months (Martínez *et al.*, 2003).. Currently, some species of silversides are at risk due to overfishing because they are an economically important fishery resource for this region (Martínez *et al.*, 2003). Despite its importance, there is a lack of information regarding growth rates and analysis of genetic effects of these species and their crosses.

The aim of this study was to estimate the genetic additive and non additive effects for *Chirostoma estor* and *Chirostoma promelas* under a complete diallel cross design.

Material and Methods

Population base

In the Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH), since 1999, are maintained in culture a population of *Chirostoma estor* and *Chirostoma promelas* with a random-mating within species. These populations were established from samples taken in lakes of Pátzcuaro and Chapala. The fish reached a size exceeding 15 cm in length, were spawned and fertilized and later, the egg was incubated in culture conditions.

Mating design

For the present study, the reproducers of the two populations described above, were used to realise a complete diallel cross with a relation 2♂: 1♀ using 110 ♂ and 55 ♀, for each genetic group; ♂*C. promelas* x ♀*C. promelas* (PP), ♂*C. estor* x ♀*C. promelas* (EP), ♂*C. promelas* x ♀*C. estor* (PE) and ♂*C. estor* x ♀*C. estor* (EE). The reproducers were put under a control program of the photoperiod (increase of hours light until reaching 16 hours light: 8 darkness), in order to extend the spawning season.

The eggs collected from each cross were obtained fortnightly during six months; however in the periods from month 2 to 3, no or very few eggs were obtained. This information was removed from the analysis. Eggs of each spawning were incubated at 21°C and maintained at a salinity of 5-10 g/L for seven days; from hatching and up to 30 days old larvae were kept in tubs of 15 L capacity with a salinity of 5 to 10 g / L and a temperature of 21 °C to 23 °C. After Hatching to 5 days old larvae were fed neonate rotifer (*Brachionus plicatilis*) of 70-100 µ, from 6 to 15 days of age, with adult rotifers (100-160 µ) and the 16 30-days of age with naupli of artemia (*Artemia franciscana*). After 30 days and up to eight months, the fish were fed ad libitum with commercial flake mixture four times a day and once a day with live food (*Artemia franciscana*) From this age, reared in tanks (3m long) with a capacity of 180 liters of fresh water in a recirculation system. In the final stage of eight to 10 months old, were housed in tanks of 1.5 m in diameter and 1 m high, with an average temperature of 25 °C, with the same management and feeding.

Growth traits

The progeny produced from each cross was measured monthly from random samples of 120 and even 300 days of age, fish were sedated using benzocaine (50 mg / l) with a dose of 5 ml / l for five minutes, weight (g) was measured with a beam balance, the number of observations was 630, 521, 263 and 256, for the genetic groups EP, PE, PP and EE, respectively. The sex of the fish could not be determined, because these species do not show sexual dimorphism before maturity, which reaches until one year of age.

For estimate the daily gain of weight was calculated (DGW), as the difference in weight between 300 and 120 days, divided by the number of passed days.

Statistical analysis

The data was analyzed with a model of repeated measures represented as:

$$y_{ijkl} = \mu + C_i + R_{j(i)} + \delta_{(ij)} + E_k + CE_{(ijk)l} + e_{ijkl}$$

Where:

y_{ijkl} are body weight and the daily gain of weight “g” obtained from the previous model; μ is the population mean; C_i is the effect of the i-th cross; $R_{j(i)}$ is the effect of j-th replicate with the i-th cross; $\delta_{(ij)}$ is the restriction error NID $(0, \sigma_\delta)$; E_k is the effect of k-th age (120 to 300 days); $CE_{(ijk)l}$ is the effect of i-th of mean observation associated to the k-th age, j-th replicated and i-th cross; e_{ijkl} is random error NID $(0, \sigma^2)$.

Genetic effects

Direct additive, direct heterosis and additive maternal effects were estimated from orthogonal contrasts.

Genotypes*				
Genetic parameter	EE	EP	PE	PP
Species difference (direct additive)	1	0	0	-1
Direct heterosis	-1	1	1	-1
Additive maternal	0	-1	1	0

*Sire species is denoted first and dam species second

E=*Chirostoma estor* and P=*Chirostoma promelas*

The previous contrast statements quantify differences attributable to the mentioned effects as follows:

$$G = \mu + (\alpha_1 - \alpha_2)g + \delta_{12}h + (\alpha_1^M - \alpha_2^M) a^M$$

Where: G is the Least squares mean of the given genetic group (crosses) G ; μ is the General Least squares mean; α_i is the proportion of genes in G from the i th

source population ($l = 1, 2$); g is the direct additive effect; δ_{12} is the probability that at a randomly chosen locus of a randomly chosen individual of G one allele is from the i th (j th) source population and the other is from the j th (i th) source population ($i, j = 1, 2$ and $i < j$); h is the direct heterotic effect; α_1^M is the proportion of genes in the dam population of G from the i th source population ($i = 1, 2$); a^M is the additive maternal effect.

Results

Table 1 shows least squares means for 120 to 300 days weight, and the daily gain of weight DGW for *C. estor* (EE) and *C. promelas* (PP) and reciprocal crosses (EP and PE); the genetic effects of crossbreeding are presented in Table 2. The results showed that *C. estor* as pure as well as mother in the cross were heavier up to 240 days of age than its reciprocal or *C. promelas* as pure ($P < 0.05$); however, they did not show significant differences for growth rate ($P > 0.05$) in the studied period.

Differences between pure species (EE vs PP) was increasing with age, meanwhile differences between crosses (PE vs EP) were similar between ages but different among them except at 210 and 300 days of age. This result shown positive heterosis at 210 days of age, however there is not a clear trend of this response for this genetic effect in the studied period.

Discussion and conclusion

A difference from what is observed in mammals (Gregory and Cundiff, 1980 Cassady *et al.*, 2002 and Rastrogi *et al.*, 1982), the fish has made interspecific crosses with viable offspring (Chevassus 1983, Bhowmock *et al.*, 1981, Hulata 1995 and Bartley *et al.*, 2001), which represents a great advantage for breeding programs in

aquaculture. However, some results through the crossings have been variable, as the works carried out in the common carp (*Cyprinus capio*) by Hulata (1995) and Wohlfarth (1993) reported differences among species and hybrids of carp some might conclude that only be useful in aquaculture; Similar results are obtained between two species of catfish (*Clarias batrachus* and *Clarias gariepinus*), where only of individuals derived from crosses between *C. batrachus* females and *C. gariepinus* males were significantly better than their reciprocal (Rahman *et al.*, 1995).

Bryden *et al.*, 2004 performed a cross in two populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) observed favourable heterosis, however, none of the heterosis exceeded the performance of the best parental, similar results be found on other species of salmon; Refstie and Gjedrem (1975) noting that the majority of salmon hybrids showed intermediate growth to their parental species, where hybrids showed a response between 20 to 50% with respect to species progenitor.

In reciprocal hybrids between *C. estor* and *C. promelas*, showed an intermediate growth with respect to species. However, heterosis response was inconsistent along the study observing negative responses to 180 and 300 days, positive 210 days of age while the other ages was close to zero; negative Heterosis were found in other crossing between different lines of tents (*Labeo rohita*) for body weight at 20 months of age (Gjerde *et al.*, 2002). On the other hand it was noted that when *C. estor* is used as maternal line, growth was higher in all ages with respect to its reciprocal

Differences between reciprocal crosses have been observed in different species, carps *Labeo fimbriatus* ♂ X *Catla catla* ♀ (Basavaraju *et al.*, 1995), catfish *Clarias referring* ♀ X *Clarias gariepinus* ♂ (Rahman *et al.*, 1995), Bass *Morone saxatilis* ♀

and *M. chrysops* ♂ (Bosworth *et al.*, 1997) and salmonids (Refstie and Gjedrem 1975); however, they do not mention any difference in the type of growth. The results of this study do not allow clear recognition of the additive and no additive effects present in crosses between these species. This may be due to the variability that occurs in the growth of fish within and between species showing a coefficient of variation of 3 to 50%.

The results of this study do not allow clear recognition of the additive and non-additive effects present in crosses between these species; this may be due to the variability that occurs in the growth of fish within and between species showing a coefficient of variation of 3 to 50%. For this reason, the lack of favourable heterosis coupled with its generally small effect when present indicates that crossbreeding for hybrid vigor is of limited utility in silversides culture.

Acknowledgements

We thank the facilities to conduct the experiment at the the Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH) and Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work was partially funded by the project PAPIIT-IN212508 (UNAM) and CONACyT 080 420.

Table 1. Least squares means and standard errors (\pm SE) for weight (g) at different age in two silversides species *Chirostoma estor* (EE) and *Chirostoma promelas* (PP) and their hybrids (PE and EP)

CROSSES				
Weight (days)	EE	EP	PE	PP
R(n)	6(17)	5(19)	3(12)	3(13)
120	0.670 \pm 0.089 a	0.333 \pm 0.058 b	0.602 \pm 0.065 a	0.303 \pm 0.092 b
150	1.505 \pm 0.200 a	1.079 \pm 0.082 b	1.370 \pm 0.117 a	0.875 \pm 0.098 b
180	1.404 \pm 0.081 a	0.869 \pm 0.058 b	1.076 \pm 0.058 a	0.750 \pm 0.102 b
210	2.031 \pm 0.211 a	1.706 \pm 0.130 b	1.799 \pm 0.119 ab	0.980 \pm 0.413 b
240	3.544 \pm 0.094 a	2.483 \pm 0.055 b	2.782 \pm 0.060 a	2.053 \pm 0.094 b
300	7.661 \pm 0.177 a	5.014 \pm 0.072 c	5.292 \pm 0.088 b	5.198 \pm 0.119 bc
GDW	0.0398 \pm 0.108 a	0.0279 \pm 0.034 a	0.0262 \pm 0.043 a	0.0311 \pm 0.068 a

R (n) =is the average number (n) of fish in the replica average (R)

GDW= Is the daily gain of weight

a,b,c, different literals between rows indicate significant differences P <0.05

Table 2. Genetic effects of crossbreeding for weight (g) at different age in two silversides species *Chirostoma estor* (EE) and *Chirostoma promelas* (PP) and their hybrids (PE and EP)

Weight (days)	Species difference (direct additive effect estimate) (g) EE vs PP	direct heterosis effect estimate (g) (HF1)	% direct heterosis	Additive maternal effect estimate (g) PE vs EP
120	0.367 ± 0.034**	-0.019 ± 0.022	-3.905	0.269 ± 0.027**
150	0.630 ± 0.065**	0.035 ± 0.046	2.899	0.291 ± 0.047**
180	0.654 ± 0.053**	-0.105 ± 0.037**	-9.703**	0.207 ± 0.038**
210	1.051 ± 0.082**	0.247 ± 0.081**	16.407**	0.093 ± 0.083
240	1.491 ± 0.166**	-0.166 ± 0.130	-5.932	0.299 ± 0.132**
300	2.463 ± 0.489**	-1.277 ± 0.310**	-19.854**	0.278 ± 0.260
GDW (g)	0.0480 ± 0.123	-0.007 ± 0.061	-21.159	0.000 ± 0.060

**P<0.01

References

- Bartley DM, Rana K and Immink AJ. 2001. The use of Inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev Fish Biol Fisher* 10: 325-337.
- Basavaraju Y, Devaraj KV and Ayyar SP. 1995. Comparative growth of reciprocal carp hybrids between *Catla catla* and *Labeo fimbriatus*. *Aquaculture* 129: 187-191.
- Bhowmick RM, Jana RK, Gupta SD, Kowtal GV and Rout M. 1981. Studies on some aspects of biology and morphometry of the intergeneric hybrid, *Catla catla* Hamilton X *Labeo rohita* Hamilton produced by hypophysation. *Aquaculture* 23: 367-371.
- Brian GB, Wolters WR and Saxtor AM. 1994. Analysis of a diallel cross to estimate effects of crossing on performance of red swamp crawfish, *Procambarus clarkia*. *Aquaculture* 121: 301-312.
- Bryden CA, Heath JW and Heath DD. 2004. Performance and heterosis in farmed and wild Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) hybrid and purebred crosses. *Aquaculture* 235: 249–261.
- Bosworth B, Libey GS and Notter RD. 1997. Egg, larval and fingerling traits of crosses among striped bass (*Morone saxatilis*), white bass (*M. chrysops*), and their F1 hybrids. *Aquaculture* 154: 201-217.
- Cassady JP, Young LD and Leymaster KA. 2002. Heterosis and recombination effects on pig growth and carcass traits. *J Anim Sci* 80. 2286-2302.
- Chevassus B. 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture* 33: 245-262.
- Gjerde B and Refstie T. 1984. Complete diallel cross between five strains of Atlantic Salmon. *Livest Prod Sci* 11: 207-226.

- Gjerde B, Reddy PVGV, Mahapatra KD, Saha JN, Jana RK, Meher PK, Sahoo M, Lenka S, Govindassamy P and Rye M. 2002. Growth and survival in two complete diallele crosses with five stocks of Rohu carp (*Labeo rohita*). *Aquaculture* 209: 103-115.
- Gjedrem T. 2004. Selection and Breeding programs in Aquaculture. Pages 364- in *Akvaforsk*, Norway, 364 pp.
- Gregory KE and Cundiff LV. 1980. Crossbreeding in beef cattle. Evaluation of systems. *J Anim Sci* 51: 1224-1242.
- Hedgecock D and Davis JP. 2007. Heterosis for yield and crossbreeding of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 272S1: S17–S29
- Hulata G. 1995. A review of genetic improvement of the corm-non carp (*Cyprinus carpiu* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture* 129: 143-155.
- Jones RE, Petrell RJ and Pauly D. 1999. Using modified length-weight relationships to assess the condition of fish. *Aquacult Eng* 20: 261-276.
- Kinghorn BP. 1983. A review of quantitative genetics in fish breeding. *Aquaculture* 31: 283-304.
- Madalena FE. 2001. Consideraciones sobre modelos para la predicción del desempeño de cruzamientos en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim* 9: 108-117.
- Maluwa AO and Gjerde B. 2006. Genetic evaluation of four strains of *Oreochromis shiranus* for harvest body weight in a diallel cross. *Aquaculture* 259: 28-37.
- Martínez-Palacios CA, Ríos-Duran MG, Campos-Mendoza A, Toledo-Cuevas M, Aguilar-Valdez MC and Ross LG. 2003. Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Patzcuaro. In. *Historia y avances del cultivo*

- de pescado blanco. ed. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca, México. 169-190.
- Mastache AA and Martínez GA. 2003. Un Algoritmo para el análisis, estimación y predicción en experimentos dialélicos balanceados. Rev Fitotec Mex 26: 191-200.
- Moncayo ER, Escalera GC and Segura GV. 2003. Los peces blancos del lago de Chapala Características generales. In. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. ed. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca, México. 51-78.
- Montesinos-López OA, Mastache-Lagunas AA, Luna-Espinoza I and Hidalgo Contreras JV. 2007. Mejor predictor lineal e insesgado combinado para aptitud combinatoria general y análisis combinado de los diseños un y tres de Griffing. Tec Pecu Mex 45: 131-146.
- Nofal R, Szendro ZS, Kenessey A and Jensen JE. 2004. Crossbreeding effects on carcass traits at 12 weeks of age in pannon and danish white rabbits and their reciprocal crosses. Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla. México. 102-109.
- Rahman MA, Bhadra A, Begum N, Islam MS and Hussain MG. 1995. Production of hybrid vigor through cross breeding between *Clarias batrachus* Lin. and *Clarias gariepinus* Bur. Aquaculture 138: 125-130.
- Rahman, M.A., T. Uehara, and M.J. Lawrence. 2005. Growth and heterosis of hybrids of two closely related species of Pacific sea urchins (Genus Echinometra) in Okinawa. Aquaculture 245: 121– 133.
- Rastogi R, Boylan WJ, Rempel WE and Windels HF. 1982. Crossbreeding in sheep with evaluation of combining ability, heterosis and recombination effects for lamb growth. J Anim Sci 54: 524-532.

- Refstie T and Gjedrem T. 1975. Hybrid between salmonidae species, hatchability and growth rate in the freshwater period. *Aquaculture* 6: 333-342.
- Tave DR, Smitherman RO and Jayaprakas. 1989. Estimate of additive genetic effects, maternal effects, specific combining ability, maternal heterosis, and egg cytoplasm effects for cold tolerance I *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquacult Fish Manage* 20: 159-166.
- Thanh MN, Ponzoni RW, Nguyen NH, Vu NT, Barnes A and Mather PB. 2009. Evaluation of growth performance in a diallel cross of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture* 287: 75–83.
- Wohlfarth GW. 1993. Heterosis for growth rate in common carp. *Aquaculture* 113: 31-46.
- Zamora BG, Vásquez PCG, Berruecos VJM and Soto RL. 1999. Estimación de algunos efectos genéticos de la trucha Arcoiris a partir de un cruce dialélico completo de dos líneas. II. Crecimiento y producción. *Vet Mex* 30: 235-241.
- Zarza-Meza EA, Berruecos-Villalobos JM, Vásquez-Peláez CG and Álvarez-Torres P. 2006. Cultivo experimental de Robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) y chucumite *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) (Perciformes, Centropomidae) en agua dulce en un estanque de concreto en Alvarado, Veracruz, México. *Vet Mex* 37: 327-333.

VII. DIVERSIDAD GENÉTICA EN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *Chirostoma* UTILIZANDO EL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI)

Ana Carmen Delgadillo-Calvillo^{*}, Carlos Antonio Martínez-Palacios^{**}, José Manuel Berruecos-Villalobos^{*}, Raúl Ulloa-Arvizu^{*}, Antonio Campos Mendoza^{***}, Rogelio A. Alonso Morales^{*} y Carlos Gustavo Vásquez-Peláez^{*}.

^{*} Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

^{**} El Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. San Juanito Itzícuaró s/n, Col. San Juanito Itzícuaró, Morelia, Michoacán, México. C.P. 58337.

^{***} Laboratorio de biología acuática de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH)

Correspondencia: E-mail: carlosgv@servidor.unam.mx

Este trabajo es parte de la tesis doctoral del primer autor.

DIVERSIDAD GENÉTICA EN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *Chirostoma* UTILIZANDO EL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI)

RESUMEN

Dentro de la familia *Atherinopsidae*, las especies de pez blanco del género *Chirostoma* son consideradas nativas de los lagos del altiplano mexicano (Pátzcuaro, Zirahuén, Chapala, Cuitzeo y Zacapu). Estas especies han sido sobreexplotadas, debido a su importancia comercial. Por otro lado la introducción y movilización de especies entre lagos, han provocado hibridaciones que dificultan la correcta identificación taxonómica de estas especies. Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la diversidad genética a partir del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) utilizando cuatro especies (*C. attenuatum*, *C. estor*, *C. promelas* y *C. lucius*) del género *Chirostoma*. Utilizando las secuencias del gen mitocondrial COI de 37 especímenes, distribuidas en cinco localidades, tres silvestres y dos en cultivo, se obtuvieron fragmentos de 627 pb. Se muestra que el grupo de *C. promelas* sólo cuatro de los siete haplotipos encontrados son exclusivos, se observó que los grupos de *C. estor* cultivado y silvestre son los que compartieron más haplotipos y que se comparte haplotipos entre las dos especies en cultivo de *C. estor* y *C. promelas*, estos resultados se pueden deber a posibles hibridaciones, que se originaron por intercambio de peces entre los lagos. Los valores de F_{ST} entre peces blancos y charales fue de 0.72, mientras que, entre los peces blancos se encuentran más cercanos con un valor de F_{ST} de 0.17, De acuerdo, a lo observado los grupos *C. estor* en cultivo y de Zirahuén, se encuentran estrechamente cercanas, mientras que el más alejado fue de Jalisco *C. lucius*.

Palabras Clave: *C. promelas*, *C. estor*, diversidad genética, hibridaciones

ABSTRACT

In the family Atherinopsidae, the silversides species of the genus *Chirostoma* are considered native to the Mexican highland lakes (Patzcuaro, Zirahuen, Chapala, and Zacapu Cuitzeo). These species have been overfished, due to its commercial importance. On the other hand the introduction and movement of species between lakes, has caused hybridizations that hinder correct taxonomic identification of these species. The aim of this study was to assess the genetic diversity from the gene cytochrome oxidase subunit I (COI) using four species (*C. attenuatum*, *C. estor*, *C. promelas* and *C. lucius*) *Chirostoma* gender. Using the mitochondrial COI gene sequences of 37 specimens, distributed in five locations, three wild and two in culture, fragments of 627 bp obtained. It is shown that the group of *C. promelas* only four of the seven haplotypes found are unique, it was observed that groups of *C. estor* cultivated and wild are those who shared more haplotypes and haplotype is shared between the two species in cultivation of *C. estor* and *C. promelas*, these results may be due to possible hybridizations, which were originated by the exchange of fish between lakes. FST values between white and charales fish was 0.72, while among the white fish are closer to an FST value of 0.17, according to the groups noted *C. blind* in culture and Zirahuén, are closely nearby, while the farthest was from Jalisco *C. lucius*.

Keywords: *C. promelas*, *C. estor*, genetic diversity, hybridization

INTRODUCCIÓN

En los principales lagos de la Mesa Central de México como lo lagos de Chapala, Pátzcuaro, Cuitzeo, Zirahuén y Zacapu (Figura 1), se distribuyen la mayoría de las especies del género *Chirostoma*, pertenecientes a la familia *Atherinopsidae*; las cuales son consideradas especies nativas de estos lagos, este género está formado por 18 especies y 6 subespecies, representado por dos grupos: el grupo Jordani formado por peces de tallas grandes, los cuales incluyen a los llamados peces blancos y el grupo Arge, al que pertenecen los peces de tallas pequeñas, comúnmente conocidos como charales. (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003 y 2005; Barriga-Sosa, 2001).

El pez blanco *Chirostoma estor* es nativo del lago de Pátzcuaro, en el cual también podemos encontrar a tres especies de charales que son *Chirostoma grandocule*, *C. attenuatum* y *C. patzcuaro*; otro lago de importancia, debido a su diversidad de peces de este género, es el lago de Chapala en el cual habitan tres especies de peces blancos (*C. promelas*, *C. lucius* y *C. sphyraena*) y seis de charales (*C. jordani*, *C. chapalae*, *C. labarcae*, *C. arge*, *C. consocium* y *C. contrerasi*) en contraste con el lago de Zirahuén, donde sólo se encuentran una subespecie de pez blanco (*C. estor copandaro*) y una de charal (*C. attenuatum zirahuén*), Sin embargo, *Chirostoma humboldtianum*, presenta la más amplia distribución no solo en estos lagos, si no también está presente en el Río Lerma y en el Lago de Juanacatlán en el estado de Jalisco (Barbour 1973; Barriga-Sosa, 2001; Miller RR, 2005; Rojas 2005)

Estas especies han sufrido una fuerte explotación, ya que *C. estor* es una de las principales especies pesqueras de gran importancia comercial, al igual que *C. promelas* que se encuentra como una especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Alaye 1996a; Barriga-Sosa, 2001; Martínez *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003; Pérez, 2005), Por otro lado, en el género *Chirostoma* existen

problemas para la correcta identificación de las distintas especies debido a las similitudes morfométricas y merísticas entre ellas (Barriga-Sosa 2001; Badillo *et al.*, 2005), aunado a la introducción y movilización de especies de este género entre los lagos (Alaye 1996a; Badillo *et al.*, 1995; Pérez, 2005), lo que ha provocado posibles hibridaciones. Por lo anterior, el cultivo del pez blanco, no solo tiene importancia comercial sino implicaciones ecológicas, para la conservación de las especies del género *Chirostoma*. Tratando de conocer mejor y proteger a estas dos especies (*C. estor* y *C. promelas*), el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), estableció un cultivo de estas especies desde 1999.

Alaye (1996) estudió el polimorfismo de la hemoglobina en diversas especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro con el fin encontrar diferencias entre especies, para así ocuparse como un método de identificación de especies de este género.

Barriga-Sosa, (2001y 2003) midieron la variabilidad genética de miembros del género *Chirostoma*, por medio de la electroforesis de marcadores moleculares aloenzimáticos, estos estudios destacan la importancia de realizar estudios a nivel molecular, con el fin de realizar una correcta identificación de las especies, debido a que existen pocas diferencias morfológicas entre estas (Barriga-Sosa, 2003). Actualmente técnicas para la identificación de especies con el uso del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI), pueden ser consideradas como herramientas moleculares confiables y ampliamente utilizadas con diferentes propósitos no solo para la identificación de especies, sino también para estudios sobre diversidad genética, taxonomía, conservación y la trazabilidad de productos procesados (Hebert, 2003; Hebert *et al.*, 2003; Meusnier *et al.*, 2008) empleado en 7 diferentes Filum del reino animal. Por lo que el objetivo del este estudio fue estimar la diversidad genética para algunas especies del género *Chirostoma* en

cultivo y silvestres utilizando el del polimorfismo del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI)

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo, colección de peces y peces en cultivo

Se utilizó una muestra de 37 especímenes obtenidos entre los años 2002 y 2010, que incluyó a tres especies de pez blanco (*C. estor*, *C. promelas* y *C. lucius*) y una especie de charal (*C. attenuatum*) obtenidas en tres poblaciones silvestres y dos de cultivo (Cuadro 1).

A partir de 1999, en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicholas de Hidalgo (IIAF-UMSNH), se mantienen en cultivo una población de *Chirostoma estor* y otra de *Chirostoma promelas* con apareamientos aleatorios dentro de especie. Estas poblaciones se establecieron a partir de muestreos realizados en los lagos de Pátzcuaro y Chapala; los peces que alcanzaron una talla superior a los 15 cm de longitud, fueron desovados y fertilizados y posteriormente, el huevo fue incubado en condiciones de cultivo.

Cuadro 1. Distribución de localidad, año y colección de las especies muestreadas

Especie	N	Localidad	Colección	Año de colecta
<i>Chirostoma promelas</i>	12	Cultivo	IIAF-UMSNH	2008
<i>Chirostoma estor</i>	8	Cultivo	IIAF-UMSNH	2008
<i>Chirostoma lucius</i>	3	Presa en "la Red" ³	IIAF-UMSNH	2009
<i>Chirostoma estor</i>	3	Zirahuén	Acuática	2002
<i>Chirostoma attenuatum</i>	4	Ukasanastacua ¹	Acuática	2010
<i>Chirostoma estor</i>	7	San Jerónimo ²	Acuática	2010

*Acuática: Colección de peces del laboratorio de biología acuática de la facultad de biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH)

* IIAF-UMSNH: Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

1 Localidad de Ukasanastacua, peces muestreados dentro del lago de Pátzcuaro

2 Localidad de San Jerónimo, peces muestreados dentro del lago de Pátzcuaro

3 Localidad "presa la Red", localizada en municipio de Tepatitlán en el estado de Jalisco



Figura 1. Localización de los lagos de Pátzcuaro, Cuitzeo, Zirahuén y Chapala en la República mexicana, de donde son endémicas las especies del género *Chirostoma*.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

De un fragmento de aleta caudal preservado en etanol al 95% se extrajo el ADN total utilizando un paquete de diagnóstico comercial (DNAeasy Blood & Tissue de Qiagen), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se utilizó un gel de agarosa al 1%, para verificar la integridad y cuantificar el ADN.

El segmento del gen mitocondrial COI (citocromo oxidasa) fue amplificado vía PCR utilizando los primers modificados de Meusnier, *et al.*, (2008) BarF1 (5'-TCC ACT AAT CAC AAR GAT ATT GGT AC-3') y MenRev1 (5'-CCT CCG GGT GCC CGA AGA ATC AG-3'). La amplificación se realizó con un termociclador

(Multigene gradiente) en un volumen total de 20 µl que contenía: 1X de Buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 1U de *Taq* polimerasa y 100 ng de ADN. Las condiciones de amplificación para la PCR fueron un ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 56°C 30 segundos y 72°C 40 segundos, seguido por una elongación final de 5 minutos a 72°C. Se tomaron 5 µl de los productos amplificados para confirmar la longitud del fragmento en un gel de agarosa al 2%, con una electroforesis, con un marcador de peso molecular y después visualizada con bromuro de etidio [5µl/ml] bajo luz ultravioleta en un transiluminador (UVP White/UV). Posteriormente se recuperó el fragmento amplificado, recortando la banda.

Los fragmentos amplificados del gen COI, fueron purificados con perlas de Silica,. Con el objetivo de evitar errores en la lectura de secuenciación se obtuvieron las secuencias en ambos sentidos por lo cual se usó un kit comercial (Big Dye terminador V.3.1 de Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl que contenía: 4 µl de Ready Reaction a 0.5 X; 2 µl de Big Dye Buffer a 0.5 X, 1.6 µl de iniciadores a 3.2 µM. Las condiciones para la reacción fueron un ciclo inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 96°C 10 segundos, 50°C 15 segundos y 60°C 4 minutos . Los productos fueron purificados con columnas de Sephadex G-50 (Sigma) y secuenciados con un secuenciador automático (Applied Biosystems ABI 3100 Genetic Analyzer).

Análisis de las secuencias

Se obtuvieron fragmentos finales de 627 pb, las cuales fueron editadas con los programas ChromasPro 1.5 (Technelysium Pty Ltd, 2003-2009) y BioEdit 7.0.5.3. (Hall, 1999). Las secuencias del gen COI fueron alineadas utilizando el Clustal W implementado en el programa MEGA 4.0.(Tamura *et al.*, 2007) para lo cual se utilizó como referencia la secuencia de *Menidia menidia* (gi|197311199: 5482-

7032; Setiamarga *et al.*, 2008) publicada en la base de datos del GenBank de la NCBI (National Resource for Molecular Biology Information).

Medidas de diversidad genética

Para evaluar la diversidad genética con el polimorfismo basado en secuencias; primero se evaluó la composición nucleotídica para las 33 secuencias que provenían de los peces blancos (*C. estor*, *C. lucius* y *C. promelas*); se calculó el porcentaje de composición nucleotídica y las tasas sustitución transicionales y transversionales con el método de sustitución nucleotídica de Máxima Verosimilitud Compuesta, implementado con el programa MEGA Ver. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Se estimó el número de sitios polimórficos (*S*) y los índices de variación genética; Diversidad nucleotídica (π), que estima el número de cualquier diferencia nucleotídica o sustitución por sitio para un grupo de secuencias.

$$\pi = \left(\frac{n}{n-1} \right) \sum_{ij} P_i P_j D_{ij}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra.

P_i y P_j = Frecuencia de los haplotipos i , y j en la muestra

D_{ij} = Es la distancia genética entre el i -ésimo y j -ésimo haplotipo

Diversidad haplotípica (h), es una medida de heterocigocidad media (Nei y Miller, 1990)

$$h = \left(\frac{n}{n-1} \right) \left(1 - \sum_{i=1}^K P_i^2 \right)$$

Donde:

n = Tamaño de muestra.

K = Número de haplotipos.

P_i y P_j = Frecuencia de los haplotipos i -ésimo

El número total de mutaciones η (η), que aparecen dentro de todas las secuencias de las poblaciones que se están estudiando, por grupo. Estas medidas de diversidad genética fueron calculadas para las secuencias de cada especie implementadas con el software DnaSP Ver. 5.10 (Librado *et al.*, 2009 y Rozas *et al.*, 2010) mediante el modelo estadístico de Tajima (Tajima, 1989)

Se obtuvo el porcentaje y número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre pares de bases empleando el método de máxima verosimilitud compuesta (Tamura *et al.*, 2004) el cual utiliza el modelo de Tamura-Nei y el número de sustitución nucleotídica entre pares de secuencias.

Análisis filogenético

Se construyó una red de haplotipos, para estimar las genealogías de genes de secuencias de ADN basadas en parsimonia estadística usando el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000) la cual provee el 95% de posibles conexiones haplotípicas.

En base al número de sustituciones nucleotídicas se construyó un árbol filogenético empleando la método Neighbor Joining, utilizando 1000 réplicas de bootstrap realizados con el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), se incluyeron las 37 secuencias de este estudio y las secuencias de *Menidia menidia* (gi|197311199: 5482-7032; Setiamarga et al., 2008), *Chirostoma jordani* (EU751742.1 Valdez-Moreno et al., 2009) y *Chirostoma rioji* (EU751750.1 Valdez-Moreno et al., 2009) como grupos externos, publicada de la base de datos del GenBank de la NCBI.

Estructura genética

Se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), mediante el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier 1995-2010) para calcular el F_{ST} , como un indicador de la diferenciación genética entre especies. Se realizaron dos análisis para comparar entre poblaciones, uno donde se incluyeron a los seis grupos y cuatro especies (*C. estor*, *C. promelas*, *C. lucius* y *C. attenuatum*) y otro comparando solo entre las especies de pez blanco.

Se calcularon las distancias genéticas medias dentro de grupo, como el número promedio de sustituciones nucleotídicas (D_X) para un par de haplotipos elegidos al azar dentro de una población X , puede ser estimado como $D_X = \frac{n_x}{n_x-1} \sum_{ij} x_i x_j d_{ij}$, donde n_x es el número de secuencias muestreadas y d_{ij} es el número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre el i -ésimo y el j -ésimo haplotipo, para calcular la distancia genética entre grupos (D_{XY}), estimado como $D_{XY} = \sum_{ij} X_i Y_j d_{ij}$, donde d_{ij} es el número de sustituciones nucleotídicas entre el i -ésimo haplotipo de la población X y el j -ésimo haplotipo de la población Y , mientras que para calcular la distancia genética neta entre grupos, como el número neto de sustituciones nucleotídicas entre dos poblaciones (D_A), estimado como $D_A =$

$D_{XY} = (d_X + d_Y)/2$; estas distancias se emplearon para construir el árbol filogenético entre grupos con el programa Phylip 3.69 y TreeView 1.6.6 (Roderic, 2001).

RESULTADOS

Se obtuvieron 37 secuencias de 627 pb para el Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI).

El porcentaje de composición nucleotídica para las 33 secuencias que incluyen solamente a las especies de peces blancos (*C. estor*, *C. lucius* y *C. promelas*) estimado fue de 22.2% para adenina, 29.9% para timina, 28.7% para citosina y de 19.3% para guanina. En el Cuadro 2 se muestran el patrón de sustitución nucleotídica relativa para el gen del citocromo oxidasa (COI) en este estudio las sustituciones transicionales fueron entre 14.94 a 22.51%, mientras que las tasas transversionales toman valores entre 2.64 a 4.09, siendo las mas altas entre T y A y entre T y G. La tasa de transición/transversión para purinas fue de 7.415 y para pirimidinas de 3.802, mientras que la tasa total de transición/transversión fué de $R=2.73$.

Cuadro 2. Estimación del patrón de sustitución nucleotídica con Máxima verosimilitud compuesta, para el gen COI

	A	T	C	G
A	-	4.09	3.93	19.59
T	3.04	-	14.94	2.64
C	3.04	15.56	-	2.64
G	22.51	4.09	3.93	-

En la diagonal se encuentran las transiciones y fuera de la diagonal las tranversiones
El análisis se incluyen a los peces blancos (*C. estor*, *C. lucius* y *C. promelas*)

En el cuadro 3 se presentan los sitios polimórficos y los 18 haplotipos encontrados para los 37 peces del género *Chirostoma*. El haplotipo 1 (H1) fue usado como secuencia de referencia, debido a que fue el que se presentó con mayor frecuencia (29.7%) y se encontró en casi todos los grupos, excepto en el de *C. lucius*, seguido del H18 (10.8%) el cual se presentó exclusivamente en las especies de *C. attenuatum*, mientras que el haplotipo H7 solo se presentó entre los grupos en cultivo *C. estor* y *C. promelas*.

La mayor diversidad haplotípica (h) la presentó el grupo de *C. estor* en cultivo de 0.92 ± 0.08 y las más bajas en los grupos de Zirahuén y Jalisco con valores de (0.66 ± 0.31) , mientras que la diversidad nucleotídica (π) más alta la presenta el grupo de Jalisco (0.42 ± 2.01), como se muestra en el Cuadro 3. El grupo de charal (*C. attenuatum*) tuvo una diversidad haplotípica y nucleotídica de 0 ya que presento un solo haplotipo (H18).

CUADRO 3. SITIOS POLIMÓRFICOS PARA EL GEN CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I, E ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA

	1 1 1 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 5 5 5 5 5 6 6 6 6 6 6																		POBLACIONES																								
																			Cultivo	Zirahuén	San Jerónimo	Jalisco	Cultivo		Frecuencia (%)																		
																			<i>C. estor</i>	<i>C. estor</i>	<i>C. estor</i>	<i>C. lucius</i>	<i>C. promelas</i>	<i>C. attenuatum</i>																			
H1	T	G	C	T	T	A	C	G	T	T	G	G	T	G	G	C	C	G	A	C	A	G	G	C	T	A	C	T	A	T	G	G	G	A	T	2	2	3	0	4	0	29.7	
H2	C	0	0	1	0	0	0	2.7
H3	2	0	0	0	0	0	5.4
H4	T	1	0	1	0	0	0	5.4
H5	A	1	0	0	0	0	0	2.7
H6	.	A	1	0	0	0	0	0	2.7
H7	A	1	0	0	0	2	0	8.1
H8	A	0	0	0	0	1	0	2.7
H9	C	.	.	C	0	0	0	2	0	0	5.4
H10	T	.	.	.	A	0	0	1	0	0	0	2.7
H11	A	A	0	1	0	0	0	0	2.7
H12	A	A	0	0	0	0	2	0	5.4
H13	C	.	.	C	A	0	0	1	0	0	0	2.7
H14	A	T	C	0	0	0	0	1	0	2.7
H15	A	C	.	.	A	0	0	0	0	1	0	2.7
H16	A	C	A	.	T	0	0	0	0	1	0	2.7
H17	C	C	A	T	0	0	0	1	0	0	2.7
H18	C	.	G	C	C	G	T	.	C	C	.	A	.	A	A	T	T	.	G	T	T	.	A	0	0	0	0	0	4	10.8	
Número de individuos																			8	3	7	3	12	4																			
No. De sitios polimórficos																			5	2	4	4	9	18																			
No. Total de mutaciones (Eta)																			5	2	4	4	10	0																			
No. De Haplotipos																			6	2	5	2	7	1																			
Diversidad Haplotípica (h) ± e.e.																			0.93 ± 0.08	0.67 ± 0.31	0.86 ± 0.14	0.67 ± 0.31	0.88 ± 0.07	0.00 ± 0.00																			
Diversidad Nucleotídica (π) ± e.e. % *																			0.23 ± 0.39	0.21 ± 1.00	0.27 ± 0.72	0.42 ± 2.01	0.36 ± 0.84	0.00 ± 0.00																			

MODELO

Los puntos indican que las bases son iguales a la secuencia base

*X 10⁻²

En el Cuadro 4 se muestra la matriz del porcentaje y número de sustituciones nucleotídicas empleando el modelo de máxima verosimilitud compuesta y el número de sustitución nucleotídica entre pares de secuencias, para los 18 haplotipos que incluyen a los peces blancos y el charal y para las tres especies de referencia obtenidas del GenBank (*M. menidia*, *C. rioji* y *C. jordani*). Se observa que el la distancia genética entre *Menidia menidia* con respecto a las especies del género *Chirostoma* fue alrededor de 14%, mientras que las especies *C. rioji*, *C. jordani* y *C. attenuatum* con respecto a las especies de peces blancos presentan distancias que van de 3.1 a 5.2%, siendo de alrededor de 0.05% a 1.1% la distancia o sustituciones nucleotídicas dentro de los 17 haplotipos.

En la figura 2. Se presenta la red haplotípica, donde el haplotipo más frecuente fué el identificado como H1 (29.7%), relacionado con casi todos los grupos, por otro lado se observa haplotipos exclusivos en los grupos: *C. promelas* (H8, H12, H14, H15 y H16), San Jerónimo (H2, H10 y H13), cultivo *C. estor* (H3, H5 y H6) Zirahuén (H11) y para *C. lucius* (H9 y H17), estos resultados también se observan en el cuadro 3.

Cuadro 4. Porcentaje y número de sustitución nucleotídica para el gen COI

	M. m	C. r	C. j	C. a	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17
M. m		80	83	81	77	76	78	78	78	78	78	78	75	78	75	78	75	78	78	81	79
C. r	14.3		33	28	21	20	22	20	22	22	22	22	21	20	23	22	21	22	22	25	23
C. j	14.9	5.5		33	27	26	28	28	28	28	28	28	27	28	27	28	27	30	28	31	29
C. a	14.5	4.6	5.5		18	17	19	19	19	19	19	19	18	20	20	20	19	21	21	22	19
H1	13.7	3.4	4.5	2.9		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	4	4
H2	13.5	3.3	4.3	2.8	0.2		2	2	2	2	2	2	1	3	3	3	2	4	4	5	3
H3	13.9	3.6	4.6	3.1	0.2	0.3		2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	5	3
H4	13.9	3.3	4.6	3.1	0.2	0.3	0.3		2	2	2	2	3	1	3	3	4	4	4	5	5
H5	14.0	3.6	4.7	3.1	0.2	0.3	0.3	0.3		2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	5	5
H6	13.9	3.6	4.6	3.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3		2	2	3	3	3	3	4	4	4	5	5
H7	13.9	3.6	4.6	3.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		2	3	3	3	1	4	4	2	3	5
H8	13.9	3.6	4.6	3.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		3	3	3	3	4	4	4	5	5
H9	13.3	3.4	4.5	2.9	0.3	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		4	4	4	1	5	5	6	4
H10	14.0	3.3	4.7	3.3	0.3	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6		4	2	3	5	4	6	6
H11	13.3	3.8	4.5	3.3	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6		4	5	5	5	6	6
H12	14.0	3.6	4.7	3.3	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.5	0.6	0.3	0.6		3	5	2	4	6
H13	13.4	3.5	4.5	3.1	0.5	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.2	0.5	0.8	0.5		6	5	7	5
H14	14.0	3.6	5.0	3.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0		4	7	7
H15	13.9	3.6	4.6	3.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3	0.6	0.8	0.6	0.8	0.3	0.8	0.6		5	7
H16	14.6	4.1	5.2	3.6	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5	0.8	1.0	1.0	1.0	0.6	1.1	1.1	0.8		8
H17	14.2	3.8	4.8	3.1	0.6	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	1.0	1.0	1.0	0.8	1.1	1.1	1.3	

*M.m: *Menidia menidia*; C. r: *Chirostoma rioji*; C. j: *Chirostoma jordani* y C. a: *Chirostoma attenuatum*.

* Por debajo de la diagonal se encuentra porcentaje de las sustituciones nucleotídicas entre especies y haplotipos ($\times 10^{-4}$), y por arriba de la diagonal se encuentran el número de sustituciones nucleotídicas.

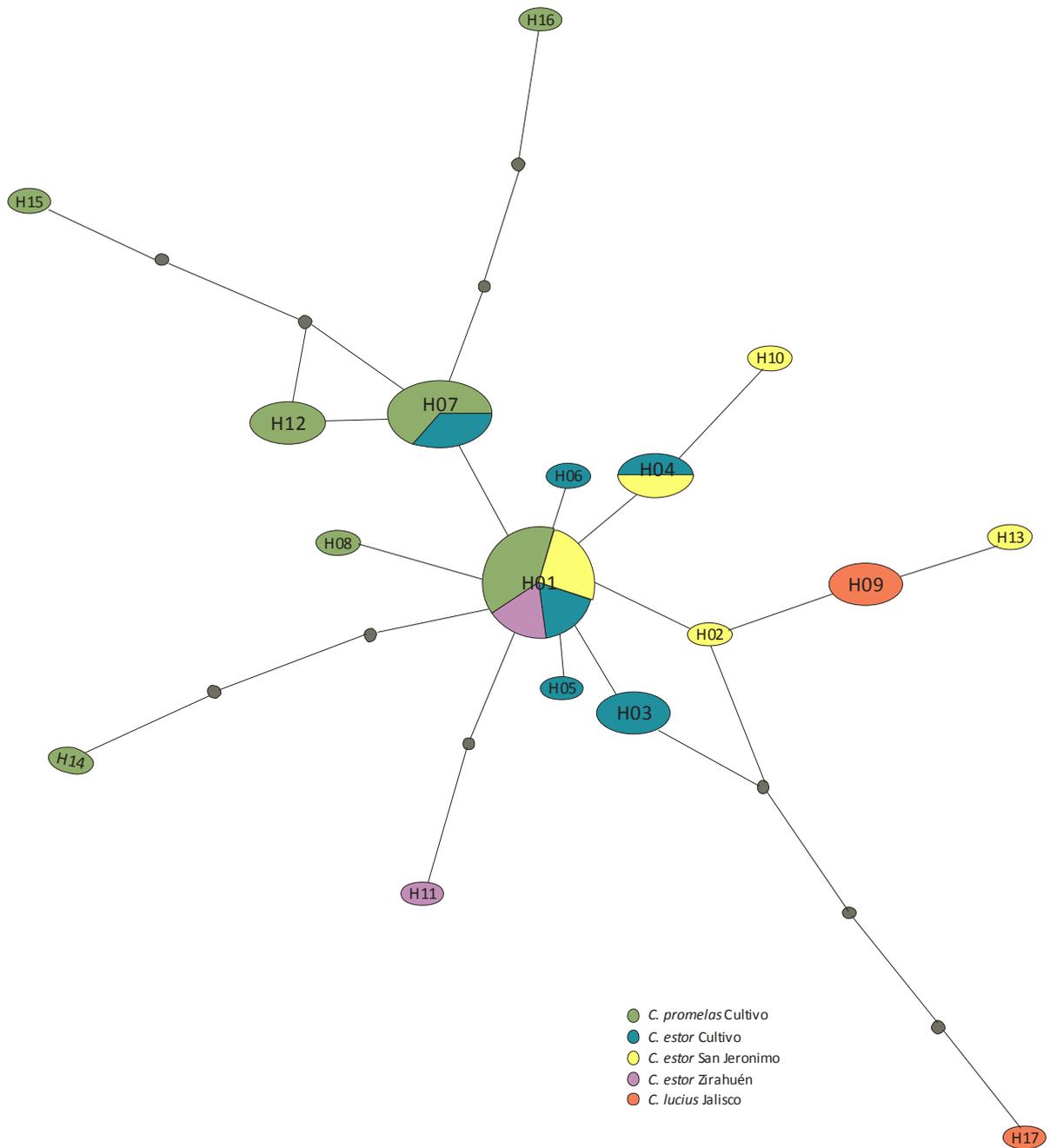


Figura 2. Red de haplotipos, se observan los 17 haplotipos encontrados excluyendo al charal *C. attenuatum*. El tamaño del círculo indica la frecuencia de los haplotipos.

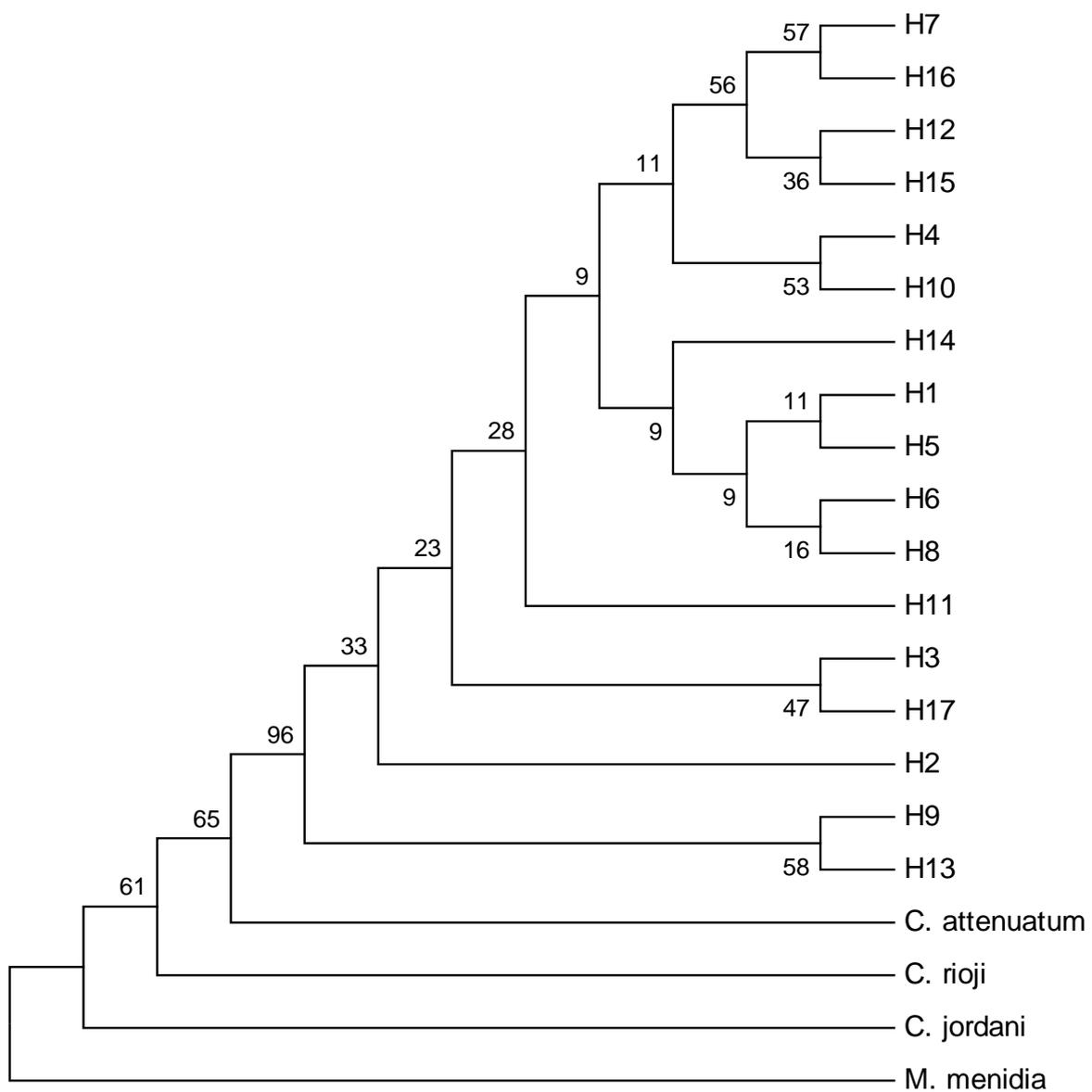


Figura 3 árbol filogenético de 21 taxas. Los números en los nodos indican el valor de bootstrap.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del dos análisis de varianza molecular AMOVA, donde se muestra los valores de F_{ST} , al comparar seis poblaciones con cuatro especies (*C. estor*, *C. promelas*, *C. lucius* y *C. attenuatum*) el valor de F_{ST} es de 0.72, mientras que al quitar a los charales y comparar solo a las especies de peces blancos el valor de F_{ST} bajo a 0.17.

Cuadro 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la secuencia del gen COI Entre seis grupos con cuatro especies (*C. estor*, *C. promelas*, *C. lucius* y *C. attenuatum*)

Fuente de variación	g.l.	suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico F
Poblaciones	5	72.63	2.34	17.64	Fst: 0.724 (P<0.001)
Dentro de poblaciones	31	27.64	0.89	27.59	
Total	36	100.27	3.23		

Entre cinco grupos con tres especies (<i>C. estor</i> , <i>C. promelas</i> y <i>C. lucius</i>)					
Fuente de variación		suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico F
Poblaciones	4	9.387	0.22	17.64	Fst: 0.176 (P<0.001)
Dentro de poblaciones	28	28.31	1.01	82.35	
Total	32	37.7	1.23		

En el Cuadro 6 se observa que la distancia genética neta (Da) entre los grupos de peces de lago de Zirahuén con respecto a los *C. estor* bajo cultivo es de 0.0001 ± 0.0001 , los cuales, se encuentran más cercanos entre sí, mientras que la distancia entre el grupo de San Jerónimo con respecto a los grupos *C. estor* en cultivo y San Jerónimo es de 0.0002 ± 0.0001 , así mismo, el grupo que presenta la mayor distancia con respecto a los grupos de *C. estor* es el grupo de *C. lucius* con distancias que van de los 0.0011 a los 0.0021, y se observa que, los grupos que se encuentran más lejanos son los el de *C. lucius* de Jalisco con respecto a *C.*

promelas en cultivo los cuales presentan entre si una distancia de 0.0026 ± 0.0016 , esto se encuentra representado gráficamente en la figura 4, con el árbol filogenético construido a partir de las distancias genéticas medias entre grupos.

Cuadro 6. Distancia genética media y neta entre grupos

	Cultivo C. estor	Zirahuén	San Jerónimo	Jalisco	Cultivo C. promelas
Cultivo C. estor	0.0023 ± 0.001	0.0023 ± 0.009	0.0027 ± 0.0010	0.0052 ± 0.0020	0.0030 ± 0.0011
Zirahuén	0.0001 ± 0.0001	0.0021 ± 0.0015	0.0027 ± 0.0011	0.0054 ± 0.0021	0.0031 ± 0.0012
San Jerónimo	0.0002 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	0.0028 ± 0.0013	0.0047 ± 0.0017	0.0034 ± 0.0012
Jalisco	0.0019 ± 0.0015	0.0021 ± 0.0015	0.0011 ± 0.0007	0.0043 ± 0.002	0.0063 ± 0.0022
Cultivo C. promelas	0.0003 ± 0.0002	0.0004 ± 0.0003	0.0005 ± 0.0003	0.0026 ± 0.0016	0.0032 ± 0.0012

Por debajo de la diagonal se encuentra la distancia genética netas entre grupos (D_a), en la diagonal se encuentran las distancias medias dentro de grupo (D_x), y por arriba de la diagonal están las distancias genéticas medias entre grupos (D_{xy})

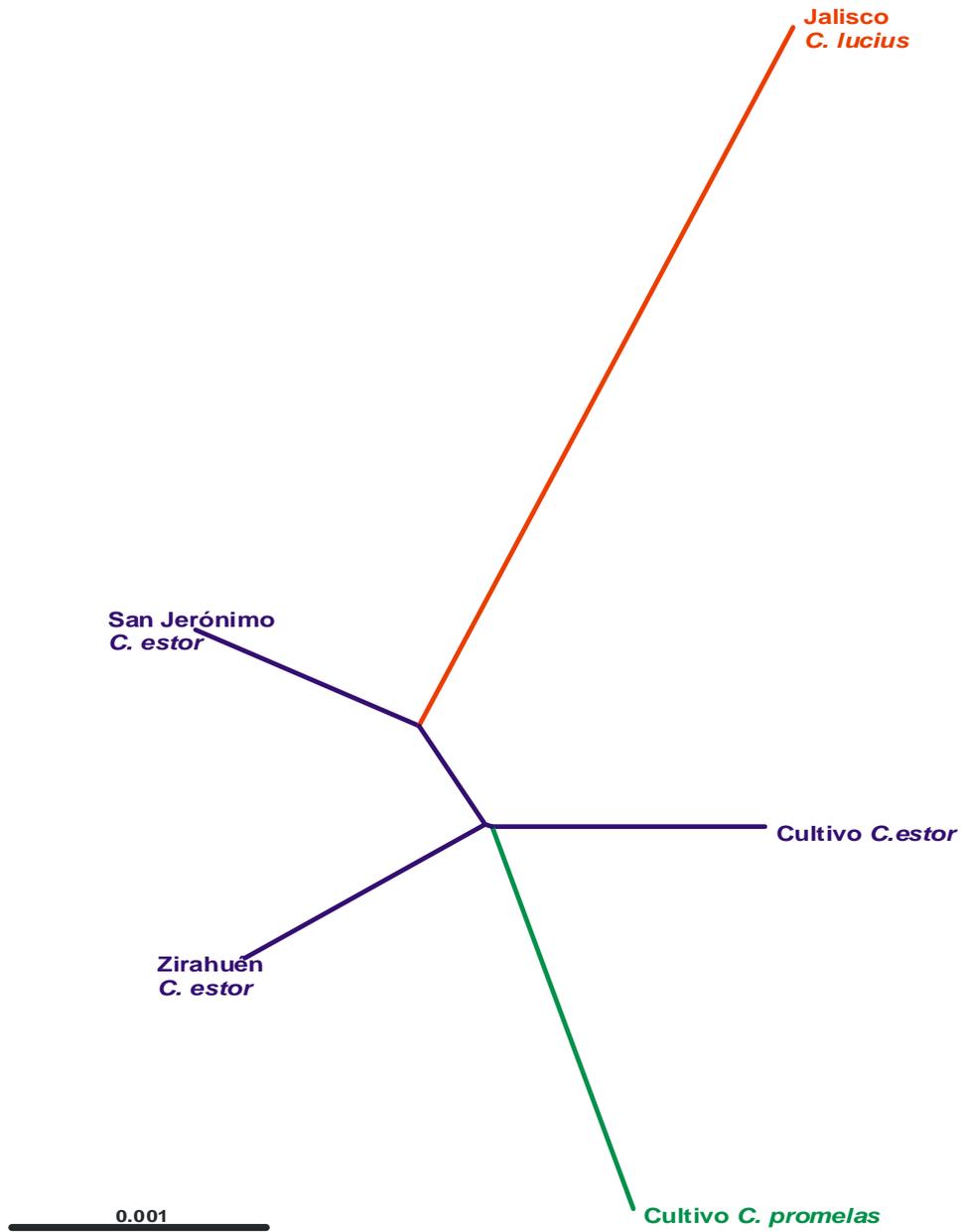


Figura 4. Dendrograma construido a partir de las distancias genéticas entre los grupos.

DISCUSIÓN

En el presente estudio el grupo de *C. lucius*, presentó dos haplotipos exclusivos (H9 y H17), mientras que *C. promelas* tuvo cuatro haplotipos exclusivos, estos resultado son similares a los analizados con el gen mitocondrial del ARN ribosomal 16S, donde hallaron haplotipos exclusivos para las especies silvestres *C. sphyraena* del lago de Chapala y *C. estor* de Pátzcuaro (Pérez , 2005).

En el presente estudio se estimó un valor de diversidad nucleotídica promedio para el grupo *Chirostoma* de 0.30, similar a la encontrada por Barriga-Sosa (2005), para el gen mitocondrial 16S, con valor de 0.38. Sin embargo, para las especies *C. estor* en cultivo y los grupos silvestres de Zirahuén y San Jerónimo, los valores de π son similares 0.23, 0.21 y 0.27, respectivamente. Mientras que la especie *C. lucius* de Jalisco fue la que mostró el nivel más alto con un valor de π de 0.42 con respecto a los otros grupos.

Barriga-Sosa (2005) utilizó el gen mitocondrial 16S y estimó que el número de substituciones nucleotídicas entre *M. menidia* con respecto a *C. estor* y *C. promelas* fue de 7.3% y 6.5%; sin embargo, en el presente estudio para el gen COI, el porcentaje de substitución nucleotídica de *M. menidia* con respecto a las especies *Chirostoma* toma valores más altos, entre el 13 y el 14%. Sin embargo, en ese mismo estudio, se encontró que el porcentaje de diferencias nucleotídicas entre las especies de peces blancos *C. estor*, *C. promelas* y *C. lucius* tuvieron valores de 1.06 a 1.6%, similares, pero ligeramente más bajas a las encontradas en el presente estudio que van 0.2 a 1.3%. Esto puede deberse a que es otro gen mitocondrial, el cual presentó menos variación dentro de estas mismas tres especies.

Asimismo, el valor estimado de F_{st} en el presente estudio para las tres especies de peces blancos fue 0.17, similar aunque más bajo al encontrado por Barriga-Sosa *et al.*, 2005, con las mismas especies el cual fue de 0.22, lo cual podría indicar que los valores de diferenciación genética entre estas especies no han variado mucho. Sin embargo, cuando en el análisis se incluye a la especie de charal *C. attenuatum* el valor de F_{ST} aumenta a 0.76 el cual muestra una gran diferenciación entre las especies de pez blanco y el charal, y que también se ve reflejado en el porcentaje de sustitución nucleotídica que en promedio es de 3% con respecto a los peces blancos.

En la figura 2 se muestra la red de haplotipos y se observa como se agrupan los haplotipos por especie, sin embargo el haplotipo H7 presente en el grupo de *C. promelas*, también lo comparte el grupo de cultivo de *C. estor*, por lo que se podría pensar en una posible hibridación entre estos dos grupos en cultivo, al igual, que los haplotipos presentes en el grupo de *C. lucius* (H9 y H17), los cuales se encuentran agrupados y relacionados al grupo de San Jeronimo (H2 y H13) esto podría indicar hibridaciones entre estas especies, a pesar de que *C. lucius* es nativo de lago de Chapala Alaye, en 1996a y 1996b, identifico individuos de *C. lucius* en al lago de Pátzcuaro. Posiblemente provocado, en los años 70, por el transplante de especies entre los lagos, con el fin de ampliar la distribución de estas especies y aumentar sus pesquerías (Rojas 2005 y Barriga-Sosa 2001). Alaye 1996b menciona que se encontraron *Chirostoma* que identifica como híbridos, por presentar características de más una especie, con los resultados observados en el presente trabajo, se corrobora la presencia de híbridos en los lagos.

En la figura 3, donde se presenta el árbol filogenético entre los 17 haplotipos y las cuatro especies de referencia, se observa como el género *Menidia*, se encuentra

alejado del género *Chirostoma*, estos resultados son similares a los encontrados por Bloom *et al.*, 2009 con el gen mitocondrial ND2.

De acuerdo a los resultados obtenidos para especies del género *Chirostoma*, la mayor distancia genética neta se encuentra entre el grupo de *C. lucius* y el grupo en cultivo de *C. promelas* con un valor de 0.0026 ± 0.0016 , ambas especies son consideradas nativas del lago de Chapala, sin embargo esta última especie se encuentra en cultivo. En contraste, las poblaciones que se encuentran más cercanas (0.0001 ± 0.0001) son entre los grupos de la misma especie de *C. estor* en cultivo y silvestres de Zirahuén y San Jerónimo, estos valores se ven reflejados en el árbol filogenético entre grupos (figura 4), donde se observa agrupados a los grupos de *C. estor* y se corrobora, que la población en cultivo fue formada por especies silvestres de los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén. Sin embargo, las poblaciones en cultivo de *C. estor* y *C. promelas* que se esperaba que estuvieran alejadas por tratarse de especies diferentes, sin embargo, presentan una distancia de 0.0003 ± 0.0002 , en el mismo árbol filogenético, se observan cercanas.

Conclusiones e implicaciones

En general las especies de género *Chirostoma* mostraron altos niveles de diversidad haplotípica y bajos niveles de diversidad nucleotídica. Las distancias netas genéticas entre grupos muestra que algunos grupos se encuentran cercanos y que comparten haplotipos entre grupos y especies, lo que posiblemente se deba a hibridaciones, que pudieron haberse originado por intercambio y/o trasplante de especies entre los lagos, aunque esta conclusión solamente está basada en el análisis de la información con un solo gen de origen mitocondrial (herencia materna), por lo que sería recomendable ampliar el estudio con más muestras silvestres, y analizarlo con algún otro gen de origen nuclear, con la finalidad de complementar la información que se tiene en este estudio.

REFERENCIAS

- Alaye RN. 1996. Estudios del polimorfismo de la hemoglobina para identificar especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. INP. SEMARNAP. Cienc Pesq 13: 1-9.
- Alaye RN. 1996. Híbridos entre especies del género *Chirostoma* del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. INP. SEMARNAP. Cienc Pesq 13: 10-17.
- Barbour DC. 1973. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces:Atherinidae): A species flock from the mexican plateau. Copeia 3: 533-566
- Barriga-Sosa IDLA. 2001. Variabilidad mormométrica, merística y molecular de especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae). Tesis Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México. D.F. 199 pp.
- Barriga-Sosa IDLA Ibáñez-Aguirre AL y Arredondo-Figueroa J.L. 2002. Morphological and genetic variation in seven species of the endangered *Chirostoma "humboldtianum species group"*(Atheriniformes: *Atherinopsidae*). Rev Biol Trop 50(1): 199-216.
- Barriga-Sosa IDLA. 2003. La importancia de los estudios de genética molecular en el género *Chirostoma*. Rev Contactos 47, 5-11.
- Barriga-Sosa IDLA, Pérez-Ramírez MY, Soto-Aguirre F, Castillo-Rivera M. y Arredondo-Figueroa. 2005. Inter-specific variation of the mitochondrial r16S gene among silversides,"Peces Blancos" (Atherinopsidae:Menidiinae)and its utilization for species identification. Aquaculture 250:637-651.
- Bloom DD, Piller KR, Lyons J, Mercado-Silva N and Medina-Nava M. 2009. Systematics and Biogeography of the Silverside tribe Menidiini (Teleostomi: Atherinopsidae) based on the mitochondrial ND2 gene. Copeia 2: 408-417.

- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9 (10): 1657-1660.
- Eguiarte EL, Souza V y Aguirre X. 2007. *Ecología Molecular*. INE-SEMARNAT, UNAM y CONABIO. México, D.F. 592 pp.
- Excoffier L. 1995- 2010 ARLEQUIN Ver. 3.5.1.2 An integrated software package for population genetics data analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>
- Hall TA. 1999. BioEditSer: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl Acids Symp* 41:95-98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and Waard JR. 2003^a. Biological Identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313-322.
- Hebert PDN, Ratnasingham S and Waard JR. 2003^b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B (Suppl.)* 270: S96-S99.
- Librado P and Rozas J. 2009. A for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Martínez-Palacios CA, Ríos Duran MaG, Campos Mendoza A, Toledo Cuevas M, Aguilar Valdez MaC and Ross LG. 2003^a. Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. En: *Historia y avances del cultivo de pescado blanco*. p169-190. Ed: Patricia Rojas Carrillo. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca. México. ISBN 968-800-540-1. 290pp.
- Meusnier S, Singer GAC, Landry JF, Hickey DA, Hebert PDN and Hajibabei M. 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*. 9:214.
- Miller RR 2005. *Freshwater fishes of México*. The University of Chicago press. Ltd., London. 490 pp.

- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press. 505 pp.
- Nei y Miller, 1990. Genetics 125:873-879
- Pérez RMY. 2005. Discriminación morfológica, molecular y determinación de la variación genética de peces blancos (Atherinopsidae: *Chirostoma*). Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Tesis de maestría.
- Rozas J, Librado P, Sánchez-del Barrio JC, Messeguer X and Rozas R. 2010. software DNAsp (DNA sequence polymorphism) Ver 5.10.01 March 04, 2010.
- Roderic DM. Page. 2001. TreeView (Win32) <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>
- Roja CPM. 2003. Cultivo de pescado blanco del lago de Pátzcuaro. Una revisión de las investigaciones del Instituto Nacional de la Pesca. En: Historia y avances del cultivo de pescado blanco. p15-28. Ed: Patricia Rojas Carrillo. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca. México. ISBN 968-800-540-1.
- Setiamarga,D.H., Miya,M., Yamanoue,Y., Mabuchi,K., Satoh,T.P., Inoue,J.G. and Nishida,M. 2008. Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences Journal Mol. Phylogenet. Evol. 49 (2), 598-605.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595
- Tamura K, Nei M and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. P Natl Acad Sci Usa 101:11030-11035.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596-1599.

Valdez-Moreno,M., Ivanova,N.V., Elias-Gutierrez,M., Contreras-Balderas,S. and Hebert,P.D. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes J. Fish Biol. 74 (2), 377-402 (2009)

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de este estudio son la primera estimación para la caracterización de crecimiento de estas especies de pez blanco y sus híbridos recíprocos en condiciones de cultivo hasta los 300 días, se observó que en general a los 300 días de edad *Chirostoma estor*, fue superior en peso y longitud a *Chirostoma promelas* y sus híbridos, sin embargo, no observaron diferencias significativas cuando se estimaron los parámetros de velocidad de crecimiento para peso (b) y longitud (r), mostrando también que los cuatro grupos genéticos, presentaron un crecimiento de tipo alométrico positivo con valores de 3.2 a 3.3 ($P < 0.05$), lo que indica que estos peces en cultivo presentan una buena condición, determinada por las condiciones de cultivo que resultó favorables.

Estos resultados relacionados con las estimaciones de heterosis, mostraron, que las cruzas recíprocas no presentaron un desempeño superior que el de sus progenitores, por lo tanto la heterosis estimada fue inconsistente y algunas negativas, estos resultados pueden deberse a la estrecha relación genética que existe entre estas especies, y posiblemente al hecho de que los individuos capturados en los lagos, que se utilizaron para formar a las poblaciones bases, podrían haber sido híbridos, debido al movimiento y trasplante de especies entre los lagos, desde los años 70 descrito por varios autores (Barbour, 1973; Alaye 1996a y 1996b; Barriga-sosa, 2001; Martínez *et al.*, 2003). Por lo tanto la falta de heterosis favorable, aunado a los bajos valores de heterosis, cuando estos están presentes, indica que el cruzamiento entre estas especies de *Chirostoma* para obtener vigor híbrido, es de limitada utilidad en estas especies en cultivo.

Al estudiar la diversidad genética dentro del género *Chirostoma*, se observó que los grupos estudiados comparten varios de los haplotipos entre especies presentando

bajos niveles de diversidad nucleotídica, estos resultados podrían suponer que algunos de los grupos presentan individuos híbridos, razón por la cual no se encontraron diferencias en el crecimiento para peso y longitud y la falta de consistencia en las heterosis.

A pesar de, que la diversidad genética estimada con el gen mitocondrial COI, es de herencia materna, es una buena herramienta para la identificación de especies, sin embargo, sería recomendable ampliar el número de individuos en el análisis e incluir otros genes de origen nuclear.