



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

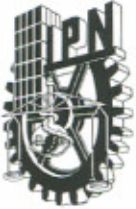
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA FILOGENIA MOLECULAR DE
LOS PECES DE LA FAMILIA GERREIDAE EN MÉXICO**

**TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
BIOL. OMAR BENITEZ CORTÉS**



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 15 del mes de Junio del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA FILOGENIA MOLECULAR DE
LOS PECES DE LA FAMILIA GERREIDAE EN MÉXICO"**

Presentada por el alumno:

BENITEZ
Apellido paterno

CORTES
materno

OMAR
nombre(s)

Con registro:

A	0	2	0	0	9	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

PRESIDENTE

DR. JOSÉ LUIS CASTRO AGUIRRE

SECRETARIO

DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

SEGUNDO VOCAL

DR. LEONARDO ANDRÉS XBITIA CÁRDENAS

TERCER VOCAL

DRA. SILVIA ALEJANDRA GARCÍA GASCA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUÍN SÁNCHEZ



I. P. N.
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 17 del mes Junio del año 2004, el (la) que suscribe OMAR BENITEZ CORTES alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A020099 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y cede los derechos del trabajo titulado: "CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA FILOGENIA MOLECULAR DE LOS PECES DE LA FAMILIA GERREIDAE EN MÉXICO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: obc1973@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

OMAR BENÍTEZ CORTES

nombre y firma

ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. OBJETIVOS.....	11
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
5. MATERIALES Y METODOS.....	12
5.1 Recolecta y transporte de organismos.....	12
5.2 Extracción de ADN genómico del fragmento de la aleta caudal de los peces recolectados.....	13
5.3 Amplificación del ADN genómico de la subunidad ribosomal 16S por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	13
5.4 Limpieza de productos de PCR.....	15
5.5 Clonación del fragmento de la subunidad ribosomal 16S.....	15
5.6 Ligación.....	16
5.7 Transformación.....	17

5.8 Inoculación de colonias en medio LB-amp.....	17
5.9 Extracción de plásmidos Minipreps.....	18
6.0 Digestión con Eco RI.....	18
6.1 Secuenciación del fragmento de la subunidad ribosomal 16S.....	19
6.2 Análisis de secuencias.....	21
6.3 Análisis filogenético.....	21
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Extracción de ADN genómico.....	23
7.2 Amplificación y clonación del fragmento de la subunidad ribosomal 16S.....	24
8. DISCUSIÓN.....	38
8.1 Extracción de ADN genómico.....	38
8.2 Amplificación y clonación del fragmento de la subunidad ribosomal 16S.....	38
8.3 Análisis de secuencias.....	39
8.4 Análisis filogenético.....	40
9. CONCLUSIONES.....	43
10. RECOMENDACIONES.....	44
11. SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO.....	45
12. LITERATURA CITADA.....	46
13. ANEXOS.....	53
13.1.....	53

GLOSARIO

Ácidos nucleicos. Existen dos tipos de ácidos nucleicos, ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxiribonucleico (ADN) (Conn *et al.*, 2001).

Base. Purina o pirimidina (Conn *et al.*, 2001).

Carácter. Cualquier rasgo o atributo de un organismo que puede ser observado o cuantificado (Villaseñor y Dávila, 1996).

Cebadores. Son secuencias de oligonucleótidos que se alinean en la región a ser amplificada. Estos son empleados para la elongación de la cadena por la ADN polimerasa (Hillis *et al.*, 1996).

Clado. Grupo monofilético (Villaseñor y Dávila, 1996).

Clonación: Proceso que requiere de aislar un fragmento de ADN, ligarlo a un vector, introducirlo a un microorganismo (generalmente bacterias) para que al crecer produzca copias puras de esa secuencia de ADN (Hillis *et al.*, 1996).

Filogenia: La expresión de las relaciones evolutivas entre los miembros de un grupo debido a su evolución a partir de un ancestro común y al cambio observado en los caracteres heredados (Villaseñor y Dávila, 1996).

Genealogía: Proceso determinado mediante características o atributos intrínsecos de los organismos, en los cuales se reflejan los cambios evolutivos (Villaseñor y Dávila, 1996).

Grupo monofilético. Un conjunto de dos o mas taxones considerados derivados de una especie ancestral (Villaseñor y Dávila, 1996).

Grupo parafilético. Grupo de organismos que comparten un ancestro común, pero el grupo no contiene a todos los miembros del clado (Villaseñor y Dávila, 1996).

Homoplasias: Cuando un carácter se desarrolla de manera independiente a partir de ancestros diferentes (Morrone, 2000).

Marcadores moleculares. Fragmentos de ADN de tamaño (peso molecular) conocido (Conn *et al.*, 2001).

Nucleósido. Base ligada por un enlace N-glicosídico de la posición 1' de la ribosa a la posición 1 de la pirimidina o a la posición 9 de la purina (Conn *et al.*, 2001).

Nucleótido. Nucleósido con uno o más grupos fosfatos esterificados al anillo de ribosa (Conn *et al.*, 2001).

Plásmidos. Moléculas de ADN de doble cadena, separadas del ADN cromosómico, con capacidad de replicación en un hospedero (bacterias o levaduras) (Conn *et al.*, 2001).

Taxón natural. Es un grupo de organismos que existen en la naturaleza como un resultado de la evolución. En el sistema filogenético hay dos clases básicas de taxones naturales: las especies y los grupos monofiléticos (Wiley *et al.*, 1991).

Vectores. Moléculas de ADN con capacidad de replicación en un hospedero como bacterias o levaduras, existen diferentes tipos (Conn *et al.*, 2001).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de los cebadores 16sarL y 16sbrH.....	14
Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR.....	14
Tabla 3. Condiciones del programa para los cebadores de secuenciación.....	15
Tabla 4. Reacción de ligación.....	16
Tabla 5. Reacción de digestión.....	19
Tabla 6. Reacción de secuenciación.....	20
Tabla 7. Condiciones del programa utilizado para los cebadores de secuenciación.....	20
Tabla 8. Resultados del análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) de las secuencias de nucleótidos del gen 16S obtenidas en este estudio.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarosa TAE (1X) al 0.7%, para observar la verificación de la extracción del ADN genómico de las muestras: <i>Diapterus peruvianus</i> , <i>Eugerres lineatus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Lutjanus peru</i> , mediante la utilización del marcador λ	23
Figura 2. Gel de agarosa TAE (1X) al 0.7%, para observar la verificación de la extracción del ADN genómico de las muestras: <i>Eugerres lineatus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Lutjanus peru</i> , mediante la utilización del marcador λ	23
Figura 3. Gel de agarosa TAE (1X) al 2%, para observar la verificación de la amplificación de la región del gen 16S ribosomal de las muestras: <i>Diapterus peruvianus</i> , <i>Eugerres lineatus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , mediante la utilización de un control negativo y un control positivo y el marcador ϕ X.....	24
Figura 4. Gel de agarosa TAE (1X) al 2%, para observar la verificación de la limpieza de productos de PCR de la región del gen 16S ribosomal de las muestras: <i>Eucinostomus dowii</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> , <i>Lutjanus peru</i> , mediante la utilización del marcador ϕ X. Gel 1 (Amplificación) y del Gel 2 (Limpieza de productos de PCR).....	25
Figura 5. Gel de agarosa TAE (1X) al 1%, para observar la verificación de la digestión de los clones de las muestras: <i>Lutjanus peru</i> y <i>Eucinostomus dowii</i> , mediante la utilización del marcador ϕ X.....	26
Figura 6. Gel de agarosa TAE (1X) al 1%, para observar la verificación de la digestión de los clones de las muestras: <i>Eucinostomus dowii</i> y <i>Lutjanus peru</i> , mediante la utilización de el marcador ϕ X.....	26
Figura 7. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Eugerres lineatus</i> (imagen tomada de <i>Fish Base</i> 2003).....	27
Figura 8. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Diapterus peruvianus</i> (imagen tomada de <i>Fish Base</i> 2003).....	28
Figura 9. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Gerres simillinus</i> (imagen tomada de <i>Fish Base</i> 2003).....	29

Figura 10. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Eucinostomus dowii</i> (imagen tomada de <i>Fish Base</i> 2003).....	30
Figura 11. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Lutjanus peru</i> (imagen tomada de <i>FishBase</i> 2003).....	31
Figura 12. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> (imagen tomada de <i>Fish Base</i> 2003).....	32
Figura 13. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de <i>Lobotes pacificus</i> (imagen tomada de <i>Fish Base</i> 2003).....	33
Figura 14. Reconstrucción del árbol mediante el método UPGMA (Uweighted pair group with arithmetic mean) por medio de caracteres moleculares de: <i>Eugerres lineatus</i> , <i>Diapterus peruvianus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Eucinostomus dowii</i> (Familia Gerreidae), <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> (Familia Serranidae), <i>Lutjanus peru</i> (Familia Lutjanidae) y <i>Lobotes pacificus</i> (Familia Lobotidade), a partir de la secuencia parcial de la subunidad ribosomal 16S.....	36
Figura 15. Reconstrucción del árbol mediante el método NJ (Neighbor joining) por medio de caracteres moleculares de: <i>Eugerres lineatus</i> , <i>Diapterus peruvianus</i> , <i>Gerres simillinus</i> , <i>Eucinostomus dowii</i> (Familia Gerreidae), <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> (Familia Serranidae), <i>Lutjanus peru</i> (Familia Lutjanidae) y <i>Lobotes pacificus</i> (Familia Lobotidade), a partir de la secuencia parcial de la subunidad ribosomal 16S.....	37

RESUMEN

El uso de datos moleculares en estudios sistemáticos, se efectúa mediante la reconstrucción de árboles a partir de las secuencias génicas de la estructura primaria de las proteínas, así como del ARN y el ADN. En el presente trabajo, se efectuó el estudio de las especies selectas de los géneros de la subfamilia Gerreinae como grupo interno: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* y *Ulaema lefroyi*, y se comparo con tres especies de familias filogenéticamente emparentadas como grupo externo: *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae). A partir de una porción de aleta caudal de cada una de las especies, fue obtenido un fragmento de la subunidad ribosomal del gen 16S ADNr, mediante clonación y secuenciación, de la cual hubo un producto final de 615 pb en promedio para cada una de ellas. La reconstrucción del árbol mediante los métodos UPGMA y del vecino cercano, soporto la monofilia de los géneros estudiados de la familia Gerreidae. Estas secuencias son los primeros informes para la familia Gerreidae, así como para las especies *Lutjanus peru* y *Lobotes pacificus*. Estos resultados marcan la pauta para realizar estudios filogenéticos en peces de estas familias con información consistente de la secuencia parcial del gen 16S ADNr.

ABSTRACT

Systematic studies with molecular data are done by the reconstruction of phylogenetic trees using the information obtained from gene sequences, protein's primary structure, RNA and DNA. In the present work the generic representatives of the Gerreinae subfamily were studied as ingroup: *Eugerres lineatus*; *Diapterus peruvianus*; *Gerres simillimus*; *Eucinostomus dowii*, *Ulaema lefroyi*, and were compared with three species of phylogenetically related families as outgroups: *Lutjanus peru* (Family Lutjanidae); *Paralabrax maculatofasciatus* (Family Serranidae); *Lobotes pacificus* (Family Lobotidae). A fragment of the ribosomal subunit gene was obtained from samples of each specie's caudal fin. The gene was cloned and sequenced with a final product of 615 bp average for each one. The reconstruction of the tree with the "neighbor-joining" and UPGMA method supported the monophyly of the genera studied. The sequences obtained are the first reported for the Family Gerreidae as well as for *Lutjanus peru* and *Lobotes pacificus*. This results mark the quote for further phylogenetic studies with partial sequences of the 16s gene for this Families.

1. INTRODUCCIÓN

El grupo de estudio, esta constituido por las especies selectas de la subfamilia Gerreinae, integrante de la familia Gerreidae, de acuerdo a lo establecido por Ortiz-Galindo et al. (2002). Esta familia esta clasificada dentro del suborden Percoidei, considerado como el grupo taxonómico más grande y diverso del Orden Perciformes, ya que contiene 71 familias, 528 géneros y cerca de 2860 especies (Nelson, 1994).

El origen y la evolución de este suborden, esta caracterizado a partir del Terciario por una considerable plasticidad adaptativa (Schultze y Arratia, 1989) y de acuerdo a su taxonomía, la familia Gerreidae se ubica dentro de los percoideos típicos, llamados así por presentar muchos caracteres generales en común (Gosline, 1966; Johnson, 1980), lo cual dificulta su identificación e incluso el poder establecer relaciones filogenéticas.

Los peces de esta familia son conocidos comúnmente como mojarras y son relativamente pequeños, de color plateado, con aleta caudal ahorquillada, boca protractil y en forma de tubo, cuya función se relaciona con la obtención de una gran variedad de invertebrados béticos (Shaefer y Rosen, 1961; Chávez y Hamman, 1989).

La familia Gerreidae se distribuye geográficamente en la mayor parte de los ambientes tropicales y subtropicales del planeta (Zahuranec, 1967; Masuda *et al.*, 1984; Deckert y Greenfield, 1987) y la región templada de Australia (Scott *et al.*, 1980).

Dentro de esta familia, Eschmeyer (1998), reconoce ocho géneros: *Gerres* Quoy & Gaimard (ex Cuvier), 1824; *Diapterus* Ranzani, 1842; *Pentaprion* Bleeker, 1850; *Eucinostomus* Baird & Girard, 1855; *Parequula* Steindachner, 1879; *Ulaema* Jordan y Evermann in Jordan, 1895, *Xystaema* y *Eugerres* Jordan y Evermann, 1927. Sin embargo existen todavía dificultades tanto taxonómicas como nomenclaturales en varias de las especies de Gerreidae, así como el reconocimiento de la validez de algunas de ellas y de su distribución anfiamericana.

Dentro de las aguas continentales de México existen representantes de cinco géneros: *Ulaema*, *Gerres*, *Eucinostomus*, *Diapterus* y *Eugerres*, (Castro-Aguirre *et al.*, 1999), que de acuerdo a Ortiz-Galindo *et al.* (2002) constituyen a la subfamilia Gerreinae; en el Pacífico oriental tropical existen cuatro de ellos de los cinco reportados: *Gerres*, *Eucinostomus*, *Diapterus* y *Eugerres* (Allen y Robertson, 1994).

A través de los estudios de filogenia se pueden establecer las relaciones evolutivas entre los grupos de organismos y su evolución a partir de un ancestro común. La filogenia estudia las relaciones evolutivas con la incorporación de información genealógica, es la historia o crónica de la evolución de las especies y se entiende como un proceso de genealogía entre grupos ancestrales y descendientes (Eldredge y Cracraft, 1980; Sober, 1988). La genealogía es determinada mediante características o atributos intrínsecos de los grupos y en consecuencia se acepta que la evolución de los grupos queda reflejada en los cambios suscitados en esas características o atributos (Villaseñor y Dávila, 1996).

Hasta el advenimiento de las técnicas moleculares, los criterios taxonómicos se basaron fundamentalmente en las semejanzas fenotípicas entre especies. De esta manera se ha propuesto la utilización de nuevos caracteres que pueden ser utilizados como buenos evaluadores de la filogenia. Los marcadores genéticos son los más utilizados, y existe una gran diversidad, desde la estructura cromosómica hasta las secuencias del ADN (Navarro y Hernández, 1999). Una ventaja fundamental de estos caracteres, es que su velocidad de evolución es más constante, en comparación con los caracteres morfológicos, que puede convertirlos en un verdadero reloj para obtener tiempos de convergencia (Pennisi, 1998).

Por lo tanto, la evaluación cronológica de las relaciones filogenéticas requiere de la utilización de moléculas con contenido informativo codificado, es decir, un cronómetro molecular, puede ser un ácido nucleico o una proteína (Bermingham *et al.*, 1997).

La hipótesis del cronómetro molecular, supone que el número de cambios en las secuencias de estas moléculas es, en cierto modo, equivalente al tiempo transcurrido desde la divergencia de dos líneas evolutivas que comparten la molécula (Fontdevila, 1987).

La molécula de ADN es una hélice larga y doble, semejante a una escalera de caracol, los eslabones de esta cadena, que determinan el código genético de cada individuo, se componen de pares de cuatro tipos de moléculas denominadas bases (adenina, timina, guanina y citosina), la adenina se empareja con la timina y la guanina con la citosina. Una cadena de la hélice se abre y queda inactiva mientras que la otra actúa como molde para formar una cadena complementaria de ARN (ácido ribonucleico). Las bases del ARN se ordenan en la misma secuencia que las bases de la cadena inactiva del ADN, con la diferencia de que el ARN, en vez de timina, contiene una base denominada uracilo (Meyer, 1994). La copia de ARN, llamada ARN mensajero (ARNm), se separa del ADN, abandona el núcleo, pasa al citoplasma de la célula y se une a los ribosomas, donde tiene lugar la biosíntesis de las proteínas. El ARNm transmite al ribosoma la información sobre la secuencia de aminoácidos que se necesitan para construir una proteína específica y el ARN transportador (ARNt), un tipo de ARN mucho más pequeño, conduce los aminoácidos al ribosoma. Cada molécula de este ARNt transporta e incorpora un aminoácido a la cadena de proteína que se está sintetizando (Fry *et al.*, 1991).

A su vez, dentro de cada una de las células se hallan las mitocondrias, minúsculas estructuras que proporcionan energía a la célula y que contienen un cromosoma circular. El ADN mitocondrial es muy parecido al de los cromosomas bacterianos, y está formado por dos cadenas complementarias, cada una con 16,569 pares de bases, pero con un peso molecular diferente: la cadena pesada H (peso molecular, 5, 168,726 daltons) contiene muchas más G que la cadena ligera L (peso molecular, 5, 060,609 daltons). La mayor parte de la cadena H constituye el molde para la transcripción de la mayor parte de los genes, mientras que la cadena L es la cadena codificadora (Meyer, 1994).

El genoma mitocondrial contiene un total de 37 genes de los cuales: 13 genes codifican para ARNs mensajeros, y por lo tanto para 13 proteínas; 22 genes codifican para 22 ARNs t (ARNs de transferencia) y 2 genes que codifican para dos RNAs r mitocondriales (RNAs ribosómicos). Entre los que se encuentran los genes 16S, el cual se ubica entre las posiciones 1,671 y 3,229 de la cadena H del ADN mitocondrial y el 12S que se encuentra entre las posiciones 648 y 1,601 de la cadena H del ADN mitocondrial (Meyer, 1994). Estos genes se consideran marcadores genéticos conservados en la escala evolutiva y existen reportes que reproducen bien la relación entre los organismos a nivel genérico (Woese, 1987).

Por lo tanto, el análisis filogenético de secuencias de genes es uno de los métodos moleculares para comprender los patrones evolutivos de los organismos y se define como el proceso de hacer inferencias biológicas a partir de las estructuras primarias de las proteínas, del ARN y del ADN (Banford *et al.*, 1999).

De esta manera, la comparación de secuencias de algunas macromoléculas, podría ser una herramienta complementaria confiable para inferir las relaciones filogenéticas, además que los datos obtenidos permitirían establecer interpretaciones cuantitativas y directas, y sería posible conformar una base de datos de referencia (Pace *et al.*, 1986; Hillis *et al.*, 1996).

Para este estudio fueron utilizadas las especies: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* y *Ulaema lefroyi*, de la subfamilia Gerreinae y de tres especies filogenéticamente cercanas de acuerdo al criterio de Nelson (1994), ya que pertenecen al grupo de los percoideos basales y que serán utilizados como grupos externos: *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae); *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae); *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), con el propósito de reconstruir el árbol filogenético con base a caracteres moleculares de la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen 16S ADNr,.

2. ANTECEDENTES

Una filogenia se desarrolla con el fin de establecer una hipótesis de las relaciones evolutivas que existen entre los taxones de un grupo monofilético (Wiley *et al.*, 1991). Las filogenias son importantes en definir e identificar adaptaciones, así como en la revisión de las hipótesis previamente establecidas.

Se han establecido diversos métodos de análisis para proponer hipótesis genealógicas entre los organismos, así como los sistemas de clasificación que reflejen tales relaciones (Villaseñor y Davila, 1996).

A causa de las dudas que puedan surgir por la utilización de métodos tradicionales a través del tiempo se han aplicado diferentes metodologías. Por ejemplo, en la metodología fenética o numérica, Sneath y Sokal (1973), definieron las relaciones evolutivas entre los organismos con base a la semejanza fenotípica de todas sus características externas, posteriormente toda esa información se ingresa a computadoras, luego se compara y se ven sus posibles relaciones.

Por su parte, en la metodología evolutiva se definen las relaciones filogenéticas con base a las características ancestrales compartidas y se emplea el elemento fósil (Villaseñor y Dávila, 1996).

Para el caso de la metodología cladista, cuyo origen radica básicamente en las ideas propuestas por Hennig (1968), se delimitan las relaciones filogenéticas mediante el establecimiento de caracteres derivados compartidos (sinapomorfias), que son los que definen a los grupos monofiléticos (Wiley *et al.*, 1991).

Para establecer un análisis filogenético se deben seleccionar los taxones que serán las unidades de nuestro estudio, elegir los caracteres que brindarán la evidencia sobre las relaciones genealógicas de los taxones estudiados, representarlas en un cladograma y traducir tales relaciones en una clasificación formal (Morrone, 2000 y 2001).

Algunos de los estudios taxonómicos clásicos realizados con representantes de la familia Gerreidae en América, han tomado como base caracteres morfológicos y de pigmentación, los cuales han sido revisiones a nivel genérico, como en el caso de *Eucinostomus* (Curran, 1942; Zahuranec, 1967), así como con los géneros *Diapterus* y *Eugerres* (Deckert y Greenfield, 1987).

Varias especies de peces marinos han sido objeto de estudio con técnicas de biología molecular, como complemento para establecer su filogenia, aunque con malos resultados obtenidos en peces no teleósteos, como en los Ascipenseridae (Birstein *et al.*, 2002), quienes desarrollaron la filogenia con caracteres morfológicos y con base en cinco genes mitocondriales (citocromo b, NADH5, región control, 16S y 12S), ya que en el caso de la filogenia molecular, la evidencia presentada no mostró una relación genealógica del grupo, sino que la hipótesis fue establecida mediante caracteres morfológicos.

Estas técnicas han mostrado ser eficaces en los percomorfos basales, como en Lampridiformes (Wiley *et al.*, 1998), quienes reconstruyeron la filogenia con un análisis de parsimonia, mediante datos morfológicos y moleculares basados en los genes 12S y 16S, con los que se corroboró la monofilia de este grupo.

En los Perciformes, se han realizado filogenias moleculares con algunos representantes de la familia Cichlidae, como la planteada por Pires *et al.* (1998), donde la evidencia molecular con base en la secuencia de un fragmento del gen 16S ADNr, corroboró la monofilia del clado neotropical. Por su parte Farias *et al.* (2000), mediante la combinación de datos morfológicos y moleculares, establecieron a *Retroculus* como el taxón basal de este mismo clado, esta evidencia fue llamada por los autores como la evidencia total, la cual hizo má consistente la hipótesis planteada.

También se han hecho estos estudios en de los Pleuronectiformes, que se considera uno de los mas derivados de la serie percomorfa, con base en secuencias de los fragmentos de genes 12S y 16S. Esto permitió establecer la monofilia del grupo y la evidencia molecular puso de manifiesto el reconocimiento de los subordenes, Psettodoidei y Pleuronectoidei (Berendzen *et al.*, 2002).

Los trabajos reportados sobre las familias involucradas en este estudio, incluyen a la familia Serranidae, donde se reevaluó el estatus taxonómico del genero *Epinephelus* con base en secuencias moleculares del gen 16S. La hipótesis propuesta previamente lo consideraba como un grupo monofilético, con base en el criterio de máxima parsimonia y mediante el método del vecino cercano se puso en evidencia que *Epinephelus* es un grupo parafilético (Craig *et al.* 2001). La filogenia de *Paralabrax* mediante los genes 16S y 12S, resaltan que es un género basal de la

subfamilia Serraninae, con base en el criterio de máxima parsimonia y al método del vecino cercano (Pondella *et al.*, 2003).

Por lo que se refiere a estudios filogenéticos cladísticos, es la reconstrucción de filogenias con base a caracteres morfológicos como el realizado por De La Cruz-Agüero (2001) para el género *Eucinostomus*. Los análisis indicaron que las especies del género *Eucinostomus* forman un grupo monofilético; dos clados bien diferenciados uno, el formado por *E. currani* y *E. melanopterus* y el otro por *E. argenteus* y *E. gracilis*; *Gerres simillinus* se postula como la especie fraterna de *Eucinostomus* y el clado formado por *Eugerres lineatus* y *Diapterus peruvianus* representa grupo ídem de los taxones anteriores.

Otro de los estudios cladísticos, es el de Ortiz-Galindo *et al.* (2002), quienes revisaron la filogenia de los representantes genéricos de la familia Gerreidae, con base en caracteres morfológicos (merísticos y osteológicos) de periodos iniciales de vida (embrión, larva, juvenil) y de adultos. En este estudio, encontraron que el grupo de los géneros americanos (*Diapterus*, *Eugerres*, *Eucinostomus*, *Ulaema* y *Gerres*) constituyen la subfamilia Gerreinae y que el género *Lobotes* persiste como el género filial de los Gerreidae.

Por su parte Ruiz-Carus y Uribe-Alcocer (2002), con técnicas moleculares, realizaron una evaluación filogenética de *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumeri* y *Diapterus auratus* basados en análisis de aloenzimas y ADN mitocondrial. Los análisis de aloenzimas indicaron una topología idéntica para las tres especies y con base en la divergencia de la secuencia del ADN mitocondrial se indicó *E. plumeri* y *D. auratus* son las más cercanos con respecto a los tres taxa.

Actualmente se realizan en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN, algunos estudios sobre sistemática, biogeografía, filogenia y ontogenia de las especies de la familia Gerreidae. Estos estudio constituyen tesis tanto de Maestría como de Doctorado, siendo los autores y trabajos los siguientes: 1) Dr. (c) José Luis Ortiz-Galindo: Estudios filogenéticos, con énfasis cladista, de géneros representativos de la Familia Gerreidae. 2) Dr. (c) Adrián F. González-Acosta: Revisión sistemática y biogeografía del género *Eugerres*. 3) Biol. Nicolás Álvarez-Pliego: Ontogenia de *Diapterus peruvianus* (Cuvier 1830) (Percoidei: Gerreidae). 4) Alberto Antuna-Mendiola: Revisión sistemática y biogeográfica de las especies americanas del Género *Gerres*.

Producto de los avances de las investigaciones anteriormente citadas, preliminarmente se ha establecido que el taxón *Gerres simillimus* Regan, 1908, considerado un sinónimo de *G. cinereus* (Walbaum, 1792), es una especie válida, con una distribución en las costas del Pacífico oriental, mientras que *G. cinereus*, se reconoce como la especie congenerica Atlántica (Antuna-Mendiola, *et al.* 2002). Por otra parte, en la revisión del género *Eugerres* (González-Acosta, 2004), se ha determinado la correcta aplicación de la nomenclatura específica de *E. lineatus*-*E. axillaris*, debido a la translocación histórica de los binomios a partir de los trabajos de Jordan y Evermann 1927. En tal contexto en el presente trabajo se siguen los criterios anteriores para la denominación de las especies de *Gerres* y *Eugerres*.

3. JUSTIFICACIÓN

A través de estudios comparativos, basados en datos morfológicos, se realizaron las primeras aproximaciones para establecer la filogenia de los peces. Posteriormente, la sistemática filogenética, propuesta por Hennig (1968), denominó lo que hoy se conoce como carácter, definido como cualquier atributo (morfológico, molecular, etológico, biogeográfico, etc.) que se observa en un organismo, cuyas diferentes manifestaciones se denominan estados, con el objeto de lograr una mayor precisión (Morrone, 2001, 2003).

A lo largo de la sistemática filogenética se han propuesto numerosos criterios para determinar la polaridad de los caracteres, aunque los únicos que se aceptan son el criterio ontogénico (Maddison *et al.*, 1984) y el de comparación con el grupo externo (Nelson, 1978). Sin embargo, no se ha podido resolver de manera total la hipótesis de algunos grupos, como el caso de la familia Gerreidae que son reconocidos por Johnson (1980) y Gosline (1966) como percoideos basales, caracterizados por no presentar caracteres distintivos, lo que ha dificultado su taxonomía y por ende el estudio de sus relaciones filogenéticas.

Para la separación de las especies de la familia Gerreidae, se han utilizado caracteres como la coloración del cuerpo y la presencia o ausencia de aserraciones, en los huesos preórbital (= lacrimal) y preópercular (Castro-Aguirre *et al.* 1999), así como el esqueleto caudal (De La Cruz, 2001).

Con base en estudios realizados con caracteres morfológicos se han logrado establecer filogenias, como las revisadas por Pondella *et al.* (2003), para el género *Paralabrax* (Perciformes:Serranidae) donde utilizó los datos de los genes 16S y 12S (ADNr), y reveló que *Paralabrax humeralis* es el miembro basal de los taxa de América central y del sur. Por su parte Farias *et al.* (2000), realizaron la unión de ambos datos, para la filogenia de los ciclidos, donde la evidencia total reveló, a *Retroculus*, *Cichla* y *Astronotus* como las líneas basales del grupo, lo cual no se había podido proponer con un solo tipo de datos.

La familia Gerreidae presenta una amplia distribución tropical y subtropical en el mundo, en particular esta bien representada en la zona anfiamericana y en las costas de México, las especies utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas por su accesibilidad a nuestra zona de estudio y con

respecto a las especies de las tres familias utilizadas en este trabajo como grupo externo, se seleccionaron por ser consideradas percoideos basales de acuerdo al criterio de Nelson (1994) y porque comparten una distribución similar en la zona de estudio, así como de accesibilidad.

Por otra parte, se ha sugerido que el gen 16S ADNr es un marcador genético conservado en la escala evolutiva y reproduce bien las relaciones filogenéticas entre los organismos a nivel de género. Con base en esto, el presente trabajo propone analizar las relaciones filogenéticas de las especies selectas de los géneros de la subfamilia Gerreinae y de tres especies de familias consideradas percoideos basales (Gosline, 1966) y emparentadas a los gerreidos de acuerdo al arreglo filogenético de Nelson (1994), que se encuentran presentes en México. Esto con el fin de establecer una relación genealógica con base en el fragmento del gen 16S ADNr.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Hacer un análisis filogenético de especies selectas de los géneros de la subfamilia Gerreinae, con base en caracteres moleculares.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar el ADN genómico (ADNg) de *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii*, *Ulema lefroyi* (Familia Gerreidae) y de tres especies de familias filogenéticamente cercanas como grupos externos: *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), presentes en México.
2. Clonar y secuenciar un fragmento del gen 16S ADNr de los representantes aislados.
3. Hacer la reconstrucción de la filogenia con base en las secuencias obtenidas del fragmento del gen 16S ADNr.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo pretende hacer un análisis filogenético con base en caracteres moleculares de un fragmento del gen 16S ADNr, de las especies selectas de los géneros de la subfamilia Gerreinae y de tres especies de familias filogenéticamente cercanas (Serranidae, Lutjanidae y Lobotidae), presentes en México.

5.1 Recolecta y transporte de organismos

Se utilizaron un total de 64 ejemplares (8 individuos de cada especie, Craig *et al.*, 2001 y Pondella *et al.*, 2003) los cuales fueron capturados en las inmediaciones de la Bahía de la Paz y en la costa de Sinaloa. Para el caso de las especies: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus* y *Eucinostomus dowii*, que pertenecen a la familia Gerreidae, fueron recolectados en las inmediaciones de la Bahía de la Paz, con ayuda de un chinchorro charalero de 30 m de largo y ½ pulgada de luz de malla. Los individuos de *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae) y *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae), se capturaron en el mismo lugar, con ayuda de una línea de anzuelo y palangre. Los de *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), en la costa de Sinaloa. Para el caso de *Ulaema lefroyi* que pertenece a la familia Gerreidae, se obtuvo mediante intercambio con la Colección Nacional de Peces que se encuentra en el Instituto de Biología, UNAM, en la Ciudad de México, D:F.

De todos los ejemplares recolectados, así como los conseguidos mediante intercambio con la Colección Nacional de Peces, fue extraído un fragmento de la aleta caudal y fijado en 1 ml de etanol absoluto en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, los tubos con las muestras fueron almacenados a (-20 °C) y transportados al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)-Unidad Mazatlán.

5.2 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN fue realizada con base en el método de “salting-out” con cloruro de sodio saturado (Miller *et al.*, 1988). El método consistió en incubar el tejido en 400 μ l de buffer de lisis y 20 μ l de proteinasa K a 55°C durante 12 horas. Una vez incubado fueron añadidos 200 μ l de NaCl saturado, el tubo fue agitado e incubado en hielo durante 10 minutos. La centrifugación fue realizada a 10,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, y el sobrenadante fue transferido (500-600 μ l) a un tubo limpio previamente preparado con 1 ml de etanol absoluto. Los tubos fueron precipitados varias veces, donde si el ADN era visible en etanol, era transferido a un tubo con 100 μ l de TE y si el ADN no era visible en etanol, era centrifugado a 13,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Una vez centrifugado, se lavó con etanol al 70% y centrifugó a 13,000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, para resuspenderse en 35 μ l de TE. La extracción fue corrida en un gel de agarosa a 0.7% en buffer Tris-acetato TAE (1X) con extractos crudos de ADN, el cual antes de que se enfriara el gel se le adicionó 15 μ l de bromuro de etidio para una concentración final de 0.5 μ g/ml y se cargó con una mezcla de 1 μ l de buffer de carga (6X) y 5 μ l de ADN para verificar la extracción. La electrofóresis fue realizada en una cámara horizontal (E-C minicell) USA a 90 volts por 60 minutos. Las bandas obtenidas en el gel se observaron colocando el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta de longitud de onda corta (302 nm, UVP 3.527, EUA). La caracterización del ADN fue analizada con base en su peso molecular al comparar las bandas con el marcador de peso molecular λ Hind III ADN digerido (Promega). Una vez realizado y visualizado, fue preparada una dilución 1:10 con TE e incubado a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente fue puesto en hielo.

5.3 Amplificación del fragmento del gen 16S (ADNr) por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para las reacciones de amplificación de ADNr a partir de ADNg, se siguió el protocolo recomendado por Palumbi (1996), en el cual, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e iniciadores (cebadores) específicos amplificó los fragmentos provenientes de la subunidad ribosomal 16S. La tabla 1 muestra las características generales de los cebadores utilizados.

Tabla 1. Características generales de los cebadores.

Cebador	Secuencia (5' - 3')
16 sarL	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
16 sbrH	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT

En resumen, fue preparada una mezcla de reacción (tabla 2) y las reacciones de amplificación fueron llevadas a un termociclador (PCR Express thermohybrid UK) de acuerdo al programa citado en la tabla 3. La confirmación de las amplificaciones fueron realizadas por medio de electrofóresis (90V, 1h) en geles de agarosa al 2% y un marcador ϕ X 174—Hae III.

Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR

REACTIVO	1 X (μ l)
Agua estéril	8.48
MgCl ₂ 25mM	0.75
dNTPs 2.5mM	0.66
Buffer 10X	1.25
Primer F (0.250 μ g μ l ⁻¹)	0.13
Primer R (0.250 μ g μ l ⁻¹)	0.13
Taq polimerasa 5u/ μ l (enzima)	0.1
Total	11.5
ADN (muestra)	1.0

Tabla 3. Condiciones del programa utilizado para la amplificación de fragmentos del gen 16S.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre-Desnaturalización	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto 30 segundos	
Alineamiento	52°C	2 minutos	35
Extensión	72°C	1 minuto 30 segundos	

5.4 Limpieza de productos de PCR

La purificación del producto de PCR fue realizada utilizando el kit de Promega, con el fin de obtener únicamente el producto deseado para su posterior clonación, el cual consistió en colocar todo el producto de PCR en un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml, al cual fue añadido 100 µl de “direct purification buffer” y agitado con un vortex (VWR Vortex mixer Scientific Industries Inc. EEUU), posteriormente se le añadió 1ml de resina y fue agitado durante un minuto, con intervalos de 20 segundos. Una vez mezclado, fue transferida la mezcla con ADN a una jeringa la cual fue colocada a una columna previamente y se presionó el embolo lentamente, posteriormente fueron añadidos 2ml de isopropanol al 80% a la jeringa y de nueva cuenta fue presionado el embolo lentamente, como siguiente paso, fue cambiada la columna al tubo eppendorf de 1.5 ml original y centrifugado durante 2 minutos a 13,000 revoluciones por minuto, una vez finalizado, la columna fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio, al cual fueron añadidos 50 µl de agua destilada estéril e incubados 1 minuto a temperatura ambiente, para finalizar el tubo fue centrifugado 1 minuto a 13,000 revoluciones por minuto. La confirmación de las purificaciones fueron realizadas por medio de electrofóresis (90V, 30 minutos) en geles de agarosa al 2% y un marcador ϕ X174-Hae III.

5.5 Clonación del fragmento del gen 16S

El proceso de clonación de ADN requirió de aislar el fragmento del gen 16S de ADNr, ligarlo a un vector, introducirlo a un microorganismo (por lo general bacterias) para que con el crecimiento

produzca copias puras de esa secuencia de ADN. Por último el ADN puro (el de interés) fue extraído de las bacterias para su secuenciación.

5.6 Ligación

La ligación fue realizada con el fin de insertar los fragmentos de ADN en un vector (en este caso es un plásmido que confiere resistencia a la ampicilina) mediante el vector pGEM-T (Easy Vector System I, Promega EEUU), el buffer para la ligasa y T4 ADN ligasa, los que son de la misma casa comercial (Promega). A partir del ADN purificado fue llevada a cabo la ligación mediante la preparación de una mezcla maestra (tabla 4), colocándose 12 μ l por tubo mas 8 μ l de ADN con un volumen final de 20 μ l por tubo, los tubos fueron incubados 2 horas a temperatura ambiente y almacenados a -20°C.

Tabla 4. Reacción de Ligación

REACTIVO	V + I (μ l)	V (μ l)
Agua	-	8
Buffer 2X	10	10
PGEM-T (vector)	1	1
ADN	8	-
T4 ADN ligasa	1	1
Total	20	20

V = vector, I = inserto.

5.7 Transformación

Una vez realizada la ligación, el siguiente paso fue la transformación, la cual se define como una alteración genética de una célula causada por tomar y expresar ADN exógeno. Los vectores (con el inserto) fueron introducidos y expresados por células competentes de *Escherichia coli*. Con el fin de eliminar el exceso de humedad, colocaron las cajas de petri con (AMP = ampicilina 25µg/ml, LB = Luria Broth Base) en la incubadora a 37°C (VWR Scientific mod. 1565 USA). Posteriormente fueron tomados dos viales (uno para insertar el ADN al vector y el otro como control) de células competentes *E.coli* (DH5α, GIBCO, California EE.UU.) las cuales fueron sacadas previamente del ultracongelador y fueron puestas en hielo para su descongelación. A su vez fue realizada la mezcla de ligación, donde fue se mezclaron 50 µl de bacterias con 5 µl de mezcla de ligación (vector + inserto) y fueron incubados en hielo durante 30 minutos, y sometidos a un choque térmico a 37°C por 20 segundos e incubados en hielo 2 minutos, una vez finalizado fue agregado 1.5 ml de SOC (2% de bacto peptona, 0.5% de cloruro de sodio, 1% de cloruro de potasio 250 mM y 2% de glucosa 1M) y transferido a tubos de 10 ml (esta operación se realizó en campana estéril y mechero), y fueron incubados 1 hora a 37°C en una incubadora con agitación a 240 revoluciones por minuto (LAB-LINE, EE.UU). Una vez realizada la incubación fueron centrifugados durante 5 minutos a 8,000 revoluciones por minuto y eliminando el sobrenadante, el cual fue resuspendido con el sobrenadante residual y utilizado para sembrar 10 µl en una caja de petri con medio LB-ampicilina previamente secadas y el resto se sembró en la otra caja, finalmente las cajas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche.

5.8 Inoculación de colonias en medio LB-amp

El levantamiento de colonias consistió en la preparación de un caldo LB-AMP (120 µl de ampicilina a una concentración de 25 mg ml⁻¹ por cada 50 ml de LB) distribuido en 2 ml en cada tubo (falcon # 2059) al momento de usar. Se levantaron 8 colonias principalmente de la caja > 10 µl y fueron seleccionadas las que se encontraron más aisladas, esto fue realizado con la ayuda de aplicadores de madera estériles. Posteriormente fue adicionado el aplicador al tubo falcón, el cual contenía 2ml

de medio LB + ampicilina previamente preparado. Finalmente las cajas fueron incubadas toda la noche en una incubadora con agitación constante a 240 revoluciones por minuto a 37°C.

5.9 Extracción de plásmidos Minipreps

La técnica de minipreps fue realizada para hacer la extracción del plásmido contenido en la bacteria (*E. coli*), para este fue utilizado el kit de Promega (Wizard Plus SV Minipreps Promega, EEUU). Primeramente fue recolectado 1.5 ml de cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml y centrifugados 1 minuto a 13,000 revoluciones por minuto y el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, fueron resuspendidos en 100 µl de buffer de resuspensión y fueron añadidos 100µl de buffer de lisis , 120 µl de buffer de neutralización, y fueron incubados 3 minutos a temperatura ambiente, una vez finalizado fueron centrifugados 1 minuto a 13,000 revoluciones por minuto y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf limpio, y fueron añadidos 200µl de isopropanol e incubado 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugaron 1 minuto a 13,000 revoluciones por minuto y fue descartado el sobrenadante, posteriormente se lavaron con 500 µl de etanol al 70% y centrifugados 1 minuto a 13,000 revoluciones por minuto, fue descartado el sobrenadante. El etanol fue eliminado y se resuspendieron en 50 µl de agua libre de nucleasas.

6.0 Digestión con Eco RI

Una vez extraído el plásmido, este fue sometió a una digestión con Eco RI, las cuales son útiles en la clonación para identificar los clones que portan la secuencia de ADN deseada y así seleccionar el clon de la muestra que se va a secuenciar. Como primer paso, fue preparada la mezcla maestra (tabla 5) agregándose 9µl / tubo + 1µl de ADN , los cuales fueron incubados a 37°C por dos horas. La verificación fue realizada en un gel de agarosa al 1% (90V, 30 minutos).

Tabla 5. Reacción de digestión

REACTIVO	1 X (μl)
Agua (estéril)	6.9
10 X Buffer ECO RI	1.0
BSA 10 X	0.1
ECO RI (enzima)	1.0
Total	9.0

6.1 Secuenciación del fragmento del gen 16S

Como último paso fue realizada la secuenciación mediante la preparación de una mezcla maestra (tabla 6). Agregando 9μl / tubo + 1μl de ADN y del volumen final (10μl) repartiendo 2 μl a cuatro tubos previamente marcados con las letras A,C,G,T. Posteriormente fue agregado 1μl de Termination mix de A,C,G,T, los cuales fueron colocados en un termociclador y se corrió el programa T7SP6 específico para los cebadores de secuenciación, el cual contiene las condiciones que se describen en la tabla 7.

Pese que se intento hacer clonar a *Ulaema lefroyi*, mediante la realización de una concentración de la muestra amplificada, esta se perdió al momento de precipitarla, lo cual no hizo posible secuenciar el fragmento. Las razones por la que no se consiguió clonar a *Ulaema lefroyi* son diversas, entre ellas el ADN fijado en formol es posible que se encontrara fragmentado, lo cual se reflejo en la extracción y el PCR, el uso de una técnica específica para material preservado que permitiera una mayor resolución.

Tabla 6. Reacción de secuenciación

REACTIVO	1 X
Agua	3.4 μ l
T7 1pmol μ l ⁻¹	0.75 μ l
SP6 1pmol μ l ⁻¹	0.75 μ l
Buffer de secuenciación	3.6 μ l
Excell II ADN (enzima)	0.5 μ l
Total	9.0 μ l
ADN (muestra)	1.0 μ l
Total por muestra	10 μl

Tabla 7. Condiciones del programa utilizado para los cebadores de secuenciación.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre-Desnaturalización	92°C	2 minutos	1
Desnaturalización	92°C	30 segundos	
Alineamiento	45°C	30 segundos	30
Extensión	70°C	1 minuto	

Una vez finalizado el programa a los tubos se les agregó 1.5 μ l de solución stop y el programa continuó con una desnaturalización a 92°C por 3 minutos y fueron guardados en el refrigerador a 4°C. Los productos de la reacción de secuenciación fueron puestos en un gel de poliacrilamida al 5.5% con un espesor de 0.2 mm y fue realizada la secuenciación en el secuenciador LI-COR Ir² (LI-COR, Inc Nebraska, EEUU). La lectura de los resultados obtenidos fue llevada a cabo con el programa e-Seq DNA Sequencing Software, Versión 1.0 (LI-COR, Inc. Nebraska, EEUU).

6.2 Análisis de las secuencias

Para poder inferir relaciones filogenéticas de genes es necesario contar con un alineamiento múltiple. La alineación de las secuencias del fragmento de la subunidad del gen 16S ADNr, de *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* (Familia Gerreidae), *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae) y *Lobotes surinamensis* (Familia Lobotidae) se realizó mediante el programa MULTIALIN

<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Las secuencias crudas fueron analizadas con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), verificando su identidad así con las especies más relacionadas, su porcentaje de homología y cantidad de bases similares.

6.3 Análisis filogenético

Los métodos de inferencia filogenético, proveen la base para seleccionar el o los mejores árboles entre todos los posibles, los cuales se obtienen, definiendo un criterio (Optimality criteria) para comparar filogenias alternativas y decidir cual es mejor, (Métodos: Parsimonia, Máxima probabilidad y Distancias). Con base en los datos, se definen dos tipos: 1.- Caracteres discretos y 2.- De similitud o distancia, estos últimos surgen de la comparación y asignación de valor de las diferencias entre los primeros (Forey *et al.*, 1992).

Los métodos de inferencia filogenético basados en la comparación de caracteres discretos son máxima parsimonia y máxima probabilidad. En contraste, los métodos basados en la comparación de distancias entre pares de secuencias son Unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) y Neighbour joining (NJ) (Forey *et al.*, 1992).

La alineación múltiple de las secuencias de nucleótidos del fragmento de la subunidad del gen 16S ADNr, fue realizada mediante el programa MULTIALIN, donde se selecciono el formato FASTA, el cual es compatible con el programa McClade 4.0, a partir de la cual se construyo la matriz. De esta

forma, se construyó una matriz de 7 taxones y 647 caracteres, la cual fue analizada por el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 1988), mediante los métodos UPGMA y (NJ), con los siguientes parámetros: Como primer paso se definió el grupo interno, el cual fue integrado por la subfamilia Gerreinae tal como la definió Ortiz-Galindo (2002). Segundo paso se definió el grupo externo, el cual fue integrado por *Lobotes pacificus*, *Paralabrax maculatofasciatus* y *Lutjanus, peru* y basado en los criterios del análisis cladístico de Ortiz-Galindo *et al.* (2002). Posteriormente se eligió el tipo de análisis y que fue el de Distancias. Una vez elegido el tipo de análisis, fueron utilizados los métodos UPGMA y NJ, y la opción de distancias de ADN fue seleccionada, utilizando el parámetro de diferencias absolutas (Pondella, *et al.*, 2003), donde los gaps y datos ambiguos se tomaron como datos perdidos, las condiciones fueron las mismas para cada método. Como último paso se prosiguió a la reconstrucción del árbol.

7. RESULTADOS

7.1 La extracción de ADN fue realizada a todas las muestras recolectadas, con el método de “salting-out” con cloruro de sodio saturado, obteniendo una banda de ADN de elevado peso molecular (fig. 1, 2), sin embargo la muestra de *Ulaema lefroyi* (fijada en formol), no le fue posible extraer el ADN.

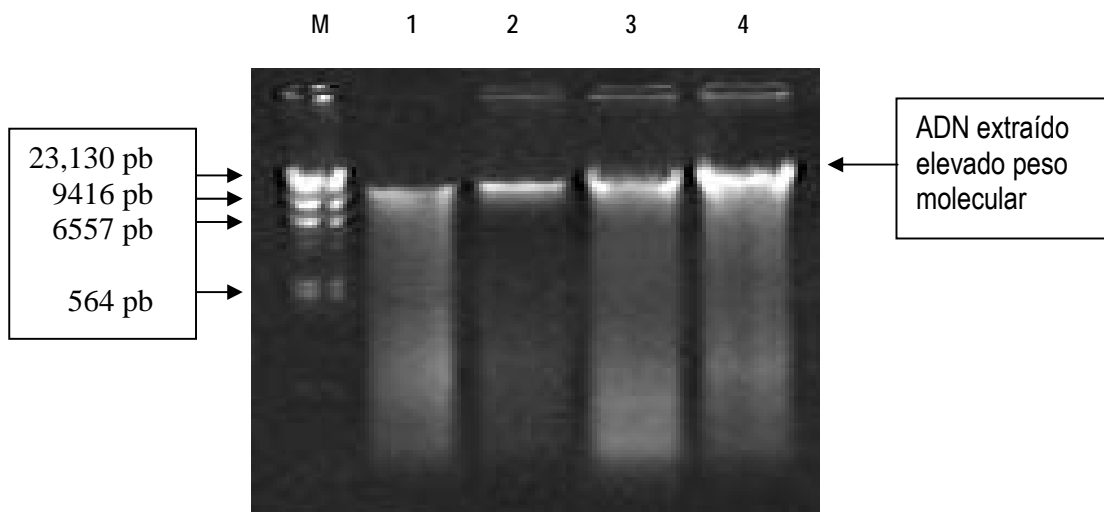


Figura 1. Gel de agarosa TAE (1X) al 0.7%, para observar la verificación de la extracción del ADN genómico de las muestras: *Diapterus peruvianus* (1); *Eugerres lineatuss* (2); *Gerres simillimus* (3); *Lutjanus peru* (4), mediante la utilización del marcador λ Hind III (M).

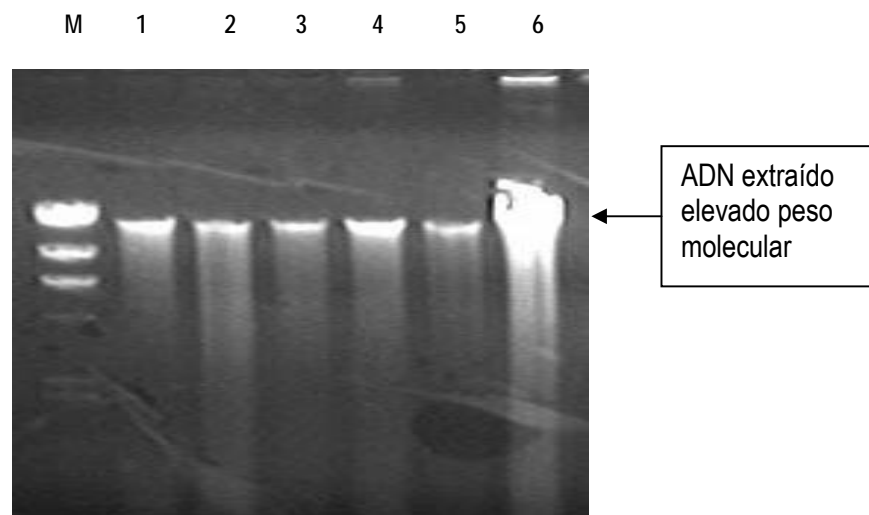


Figura 2. Gel de agarosa TAE (1X) al 0.7%, para observar la verificación de la extracción del ADN genómico de las muestras: *Eugerres lineatus* (1); *Gerres simillimus* (2); *Gerres simillimus* (3); *Gerres simillimus* (4); *Gerres simillimus* (5); *Lutjanus peru* (6), mediante la utilización del marcador λ Hind III (M).

7.2 Amplificación del gen 16S (ADNr) mediante la utilización de los oligos 16sarL y 16sbrH (Palumbi, 1996) en ADNg.

Un producto de ~ 630 pb fue amplificado con los oligos 16sarL y 16sbrH (fig. 3). Este fragmento amplificado en todas las muestras que fueron recolectadas del medio natural, las cuales fueron verificadas mediante un gel de agarosa al 0.7%.

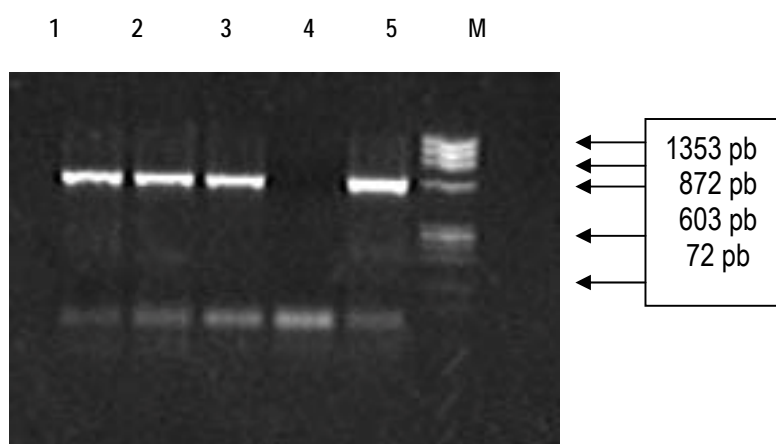


Figura 3. Gel de agarosa TAE (1X) al 2%, para observar la verificación de la amplificación de la región del gen 16S ribosomal de las muestras: *Diapterus peruvianus* (1); *Eugerres lineatus* (2); *Gerres simillimus* (3); mediante la utilización de un control negativo (4) y un control positivo (5) y el marcador ϕ X 174-Hae III (M),.

Una vez que el producto de PCR fue verificado, se llevo a cabo la limpieza de productos de PCR a 3 individuos de una misma especie (fig. 4) dando un total de 21 purificaciones.

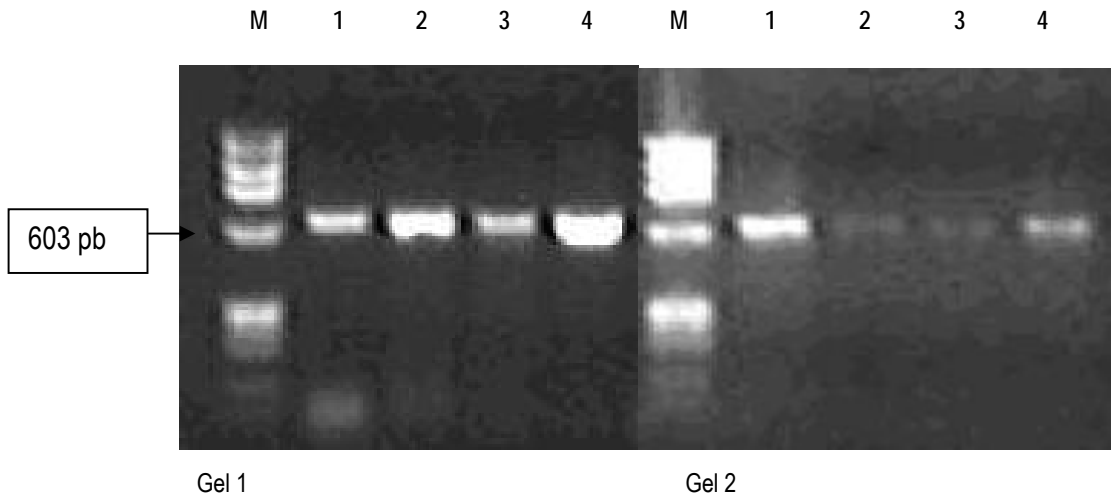


Figura 4. Gel de agarosa TAE (1X) al 2%, para observar la verificación de la limpieza de productos de PCR de la región del gen 16S ribosomal de las muestras: *Eucinostomus dowii* (1); *Gerres simillimus* (2); *Paralabrax maculatofasciatus* (3); *Lutjanus peru* (4), mediante la utilización de el marcador ϕ X 174-Hae III Amplificación) y Gel 2 (Limpieza de productos de PCR).

En total se realizaron 21 ligaciones 21 transformaciones, 168 levantamientos de colonias, 168 extracciones de plásmidos, 168 digestiones (fig. 5 y 6) y por ultimo paso, 63 reacciones de secuenciación, obteniéndose un producto de aproximadamente 630 pb. Las secuencias fueron condensadas y sometidas a una restricción con la enzima Eco RI para descartar la secuencia del vector y obtener solo la secuencia de interés (fig. 7-13).

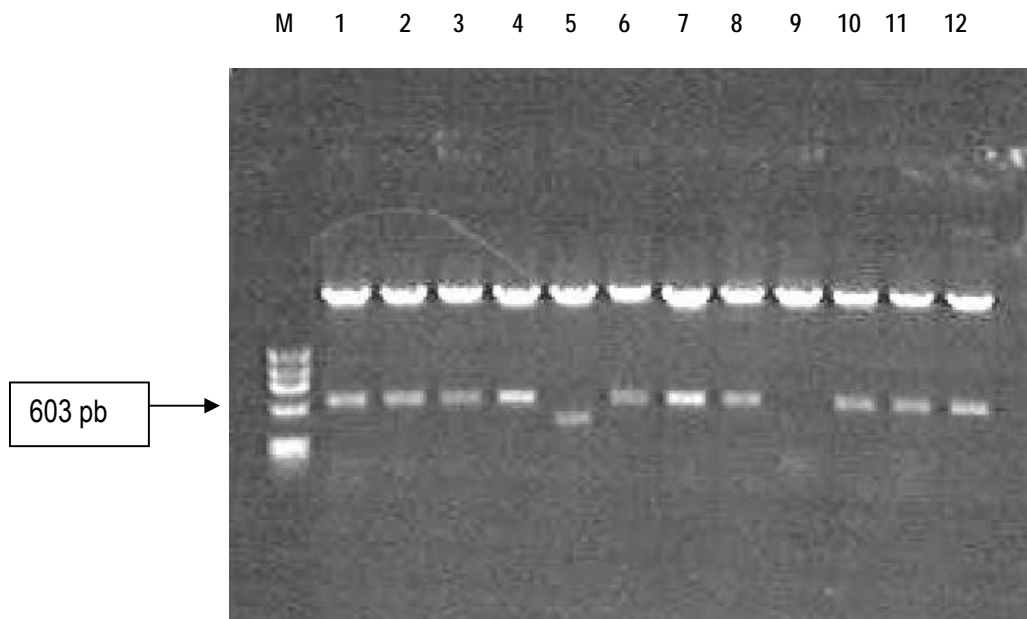


Figura 5. Gel de agarosa TAE (1X) al 1%, para observar la verificación de la digestión de los clones de las muestras: *Lutjanus peru* (1-9) y *Eucinostomus dowii* (10-12), mediante la utilización de el marcador ϕ X 174-Hae III (M).

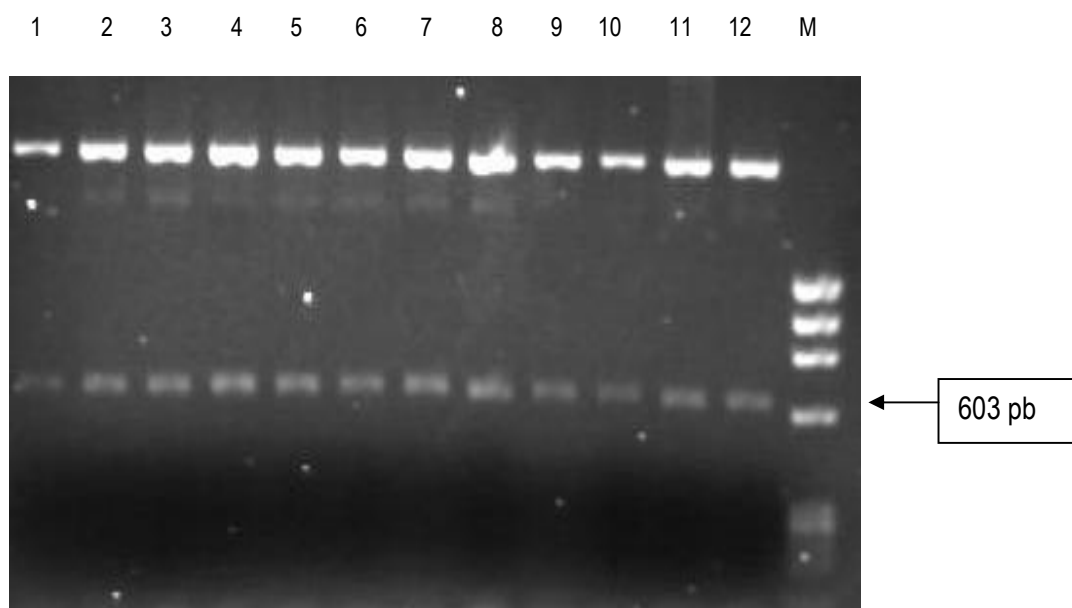


Figura 6. Gel de agarosa TAE (1X) al 1%, para observar la verificación de la digestión de los clones de las muestras: *Eucinostomus dowii* (1-6) y *Lutjanus peru* (7-12), mediante la utilización de el marcador ϕ X 174-Hae III(M).

SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN 16S RIBOSOMAL

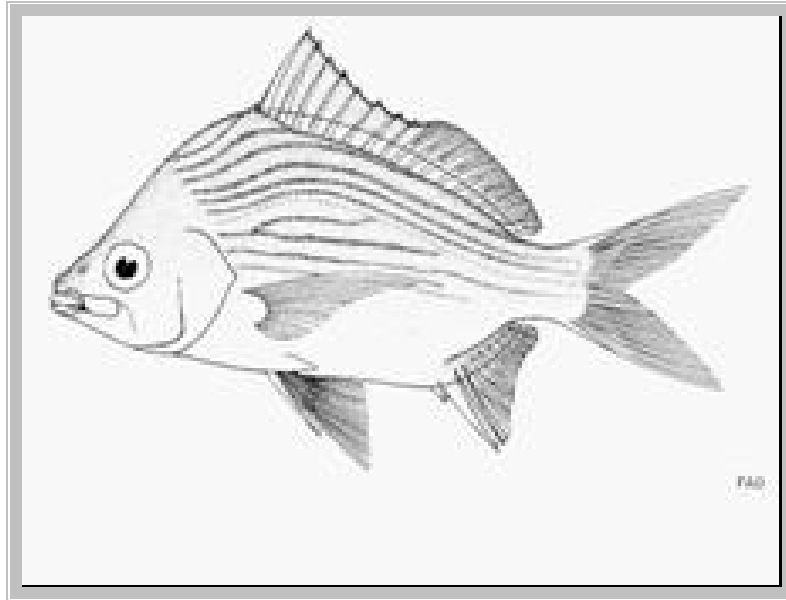


Figura 7. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Eugerres lineatus* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```
5'CGCCTGTTTATCAAAAACATCGCCTCTTGTGACCCCAAATAAGAGGTCCTGCCTGCCCCGTG
ACTAAACGTTTAACGGCCGCGTACTTTGACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAAT
GGAGACCGGTATGAATGGCAAGACGAGGGCCTGACTGTCTCCTTTTTCCAGTCGATGAAATTGA
TCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTAACACATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAGCTTTAGACACC
AAGGCAGCCTGCGTTACACAACCCCTCATAAGGACCTAAACAGAGCCGACCCTGCCTCCATGTC
TTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAAACAAAAACCCCGCGTGGACAGGGAGAATTCTTACTCC
TACAGACAAGAGCGCCCGCTCTAATTAACAGAACTCTGACCTTCCAGATCCGGCCAAGCCGAT
CAACGAACCGAGTTACCCAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTCAGAGCTCATATCGACAAAAG
GGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTACTGGTGCAGAAGCTATTAAGGGTTCGTTT
GTTCAACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG 3'
```

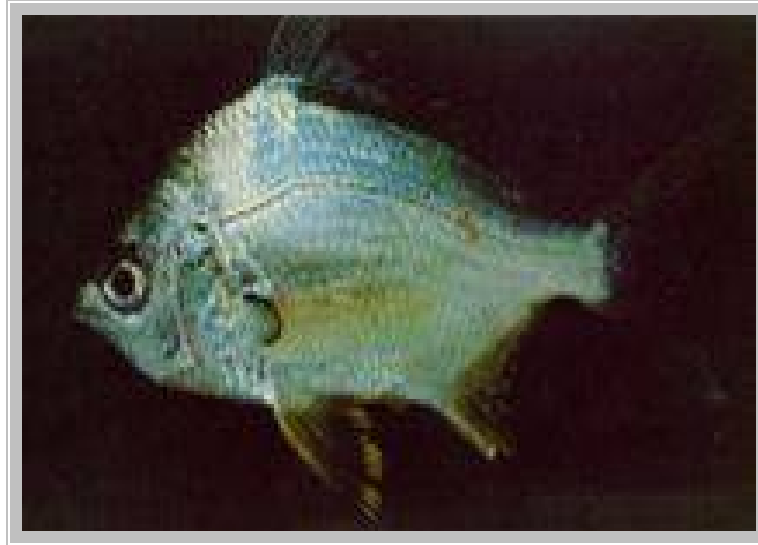


Figura 8. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Diapterus peruvianus* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```
5'CCGCCTGTTTATCAAAAACATCGCCTCTTGCAACCCACAAATAAGAGGTCCTGCCTGCCCCGT  
GACTATACGTTTAACGGCCGCGGTACTTTGACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAA  
ATGGAGACCGGTATGAATGGCAAGACGAGGGCCTGACTGTCTCCTTTTTCCAGTCAATGAAATT  
GATCCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTAGCACATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAGCTTTAGAC  
ACCAAGACAGCATTATGTTACACAACCCTATTTAAAAGGCCCGAAACAAAATAAACCTGCCTAA  
ATGTCTTTGTTGGGGCGACCCCGGGGAAAGAAAAACCCCTGCGTGGAAAGGGAGAAACT  
ATATCTTCCHACAGACAAGAGCCCCGCTCTAATTAACAGAACACTCTGACGTACCAGATACGG  
CCTCGCCGATCAACGGACCGAGTCACCCTAAGGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTCTGAGCTCA  
TATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTACTGGTGCAGAAGCTATT  
AAGGGTTCGTTTGTGCAACGATTAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG 3'
```




Figura 9. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Gerres simillimus* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```
5'CGCCTGTTTATCAAAAACATCGCCTCTTGCAACTAACAAATAAGAGGTCCCGCCTGCCAGTG  
ACTATATGTTAACGGCCGCGGTATTTGACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAAA  
TGAATATCTGTATGAATAGCACGACGAGGGCTTGACTGTCTCCTTTTTCCAGTCAGTGAAATTGA  
TCTCCCGTGCAGAAGCGGGGATTCAAACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACTCT  
CCGAGCAGACTATGTTAAACACCCTCAATAAGAGACTAAACAAGTATAGACTCTGCTCTAATGT  
CTTTGGTTGGGGCGACCCTGGGGAAAAACAAAACCCCATGAAGACAGGAAGAAGTTTCTCCCA  
CAAACAAGAGCTACGGCTCTAGTTAACAGAACCTCTGACTTGCATGATCCGGCCTGCGCCGATC  
AACGGACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGCTCATATCGACAAGGGG  
GTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGT  
TCAACGATTAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG3'
```



Figura 10. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Eucinostomus dowii* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```
5'CGCCTGTTTTTAAAAACATCGCCTCTTGCAACTAACAATAAGAGGTCCCGCCTGCCAGTG  
ACTATATGTTTAAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAAA  
TGAAGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTGACTGTCTCCTTTTTCCAGTCAGTGAAATTGA  
TCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTCAAACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACTCT  
CCGAGCAGACTATGTTAAACACCCTTCAATAAGAGACTAAACAGTACAGACTCTGCTCTAATGTC  
TTTGGTTGGGGCGACCCTGGGGAAAAACAAAACCCCCCATGAAGACAGGAAGAAGTTTCTCCCA  
CAAACAAGAGCTACGGCTCTAGTTAACAGAACCTCTGACTTACATGATCCGGCCTGCGCCGATC  
AACGGACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGCTCATATCGACAAGGGG  
GTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCTATAGGGTTCGTTTGTTC AAC  
GATTAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG3'
```

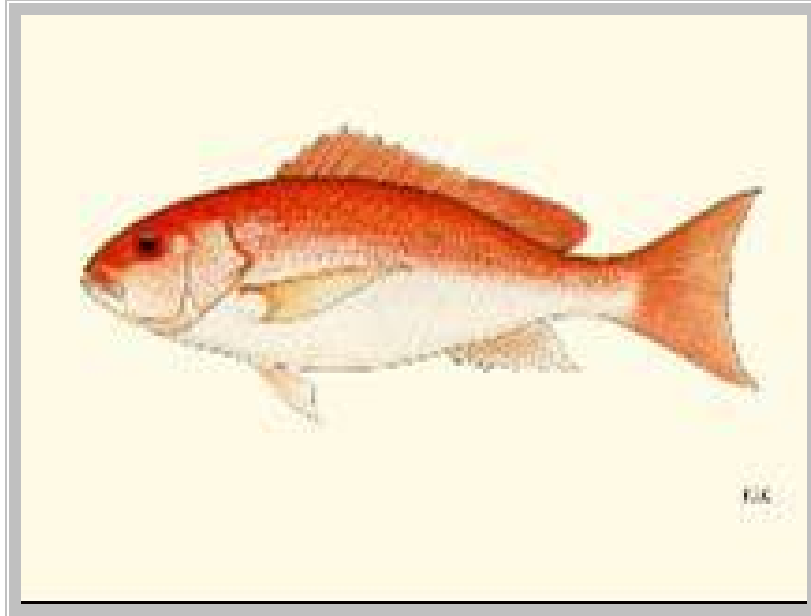


Figura 11. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Lutjanus peru* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```

5'CGCCTGTTTACCAAAAACACCCCCTCTDAAAAAATCAATAAAAAGAGGTCCCGCCTGCCCTGT
GACTATAAGTTTAACCGCCGCGGTATTTTGACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAA
ATGGAGACTTGTATGAATGGCATAACGAGGGCTTAGCTGTCTCCTCTTTCAAGTCAATGAAATTG
ATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATACTTACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAC
CAAGACAGACCATGTTAAACATCCCAAAACAAAGGACCAAACCAAATGGCCCCTGCCCTAATTTT
TTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGAAACACAAAACCCCCACGTGGAACGAGAGCACCTCCTCTC
ACAACCAAGAGCTCCCGCTCTAGGTGAACAGAAATTCTGACCAACTAGATCCGGCAAAGCGCGA
TCAACGGACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGGCCATATCGACAAGG
GGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTTCGTT
TGTTCAACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG3'

```



Figura 12. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Paralabrax maculatofasciatus* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```
5'CGCCTGTTAATCAAAAACATCGCCTCTTGATAAAAAACATAAGAGGTCCTGCCTGCCAGTG  
ACCACGTGTTCAACGGCCGCGGTATTTTAACCGTGAAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAA  
TGGGGACCTGTATGAATGGCACGACGAGGGCTTGACTGTCTCCTCTCTCCAGTCAATGAAATTG  
ATCTCCCGTGCAGAAGCGGGATAAAACCATAAGACGAGAAGACCCTATGAAGCTTTAGACGC  
CATGACAGATTATGTTAAACAACCCTTTTAAAGGAATAAACCTAGTAACCCCTGTCCAAATGTCTT  
TGGTTGGGGCGACCGCGGGAAATAAATAACCCCATGTGGACTGAGAGAATAACTCTCTTAC  
AACCAGAGCTACAGCTCTAAGTAACAAAATTTTTGACCTAAAGGATCCGGCAATGCCGATCAAC  
GAACCGAGTTACTCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGTCCTATCGACAAGGGGTTT  
ACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGGCRGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGA  
TTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG3'
```



Figura 13. Secuencia de consenso obtenida de los clones correspondientes al fragmento del gen 16S (ADNr) de *Lobotes pacificus* (imagen tomada de *Fish Base* 2003).

```
5'CGCCTGTTTATCAAAAACATCGCCTCTTGTAACAACAATAAGAGGTCCCACCTGCCAGTG
ACTATATGTTCAACGGCCGAGTATTTAACC GCGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAA
TGGGGACCAGTATGAATGGCATCACGAAGGCTTAACTGTCTCCTCTTTCAAGTCAATGAAATTGA
TCTCCCGTGCAGAAGCGGGTATATTAACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGATATTA
AGCAGACTGTGTTAAGCACCCATTAAGGACTAACTTAACGGCCCCTGTCTTAATACCTTTGGT
TGGGGCGACCATGGGGAATAAGAACCCCCACGTGGACTGTAGACCTACATCATCTTTTAACTA
AAGTCTAATAAACTAAGAGCCCCGCTCTAACACTCAGAACACTCTGACCAAATAAGATCCGGC
AAAGCCGATCAACGGACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCATAT
CGACAAGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAG
GGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCG3'
```

Con base a los resultados del análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), de la base de datos del GenBank, se compararon las secuencias obtenidas para *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowi* (Familia Gerreidae), *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae) (tabla8).

La especie mas cercana de los géneros de la familia Gerreidae es *Pterocaesio tile*, la cual esta considerada como miembro de Lutjanidae, con un porcentaje de homología de acuerdo a la proporción encontrada del 86 %.

La especie mas cercana a *Lutjanus peru*, es *Lutjanus decussatus*, con un porcentaje de homología del 96 %.

La especie mas cercana de *Paralabrax maculatofasciatus*, fue *Paralabrax nebulifer* con una homología del 95 %.

Por ultimo, la especie mas cercana a *Lobotes pacificus*, fue *Pterocaesio tile* con una homología del 85 %.

Tabla 8. Resultados del análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) de las secuencias de nucleótidos del gen 16S obtenidas en este estudio.

Especie	Especie mas cercana	Familia	Orden	No. de Acc. ^a	ID ^b	Hom. ^c
<i>Eugerres lineatuss</i>	<i>Pterocaesio tile</i>	Lutjanidae	Perciformes	AP004447	539/621	85%
<i>Diapterus peruvianus</i>	<i>Pterocaesio tile</i>	Lutjanidae	Perciformes	AP004447	539/630	85%
<i>Gerres simillimus</i>	<i>Pterocaesio tile</i>	Lutjanidae	Perciformes	AP004447	543/623	87%
<i>Eucinostomus dowii</i>	<i>Pterocaesio tile</i>	Lutjanidae	Perciformes	AP004447	537/623	87%
<i>Lutjanus peru</i>	<i>Lutjanus decussatus</i>	Lutjanidae	Perciformes	AF247445	546/568	96%
<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	<i>Paralabrax nebulifer</i>	Serranidae	Perciformes	AY072676	572/600	95%
<i>Lobotes pacificus</i>	<i>Pterocaesio tile</i>	Lutjanidae	Perciformes	AP004447	543/637	85%

^a Número de acceso de la información de la especie en el GenBank

^b Proporción de identidades encontradas en el BLAST solicitada/base de datos

^c Porcentaje de homología de acuerdo a la proporción encontrada

La reconstrucción de los árboles mediante los métodos UPGMA y NJ, dieron diferentes topologías, sin embargo en ambos las especies de la familia Gerreidae forma dos clados bien diferenciados que coinciden en ambos métodos (fig. 14 y 15).

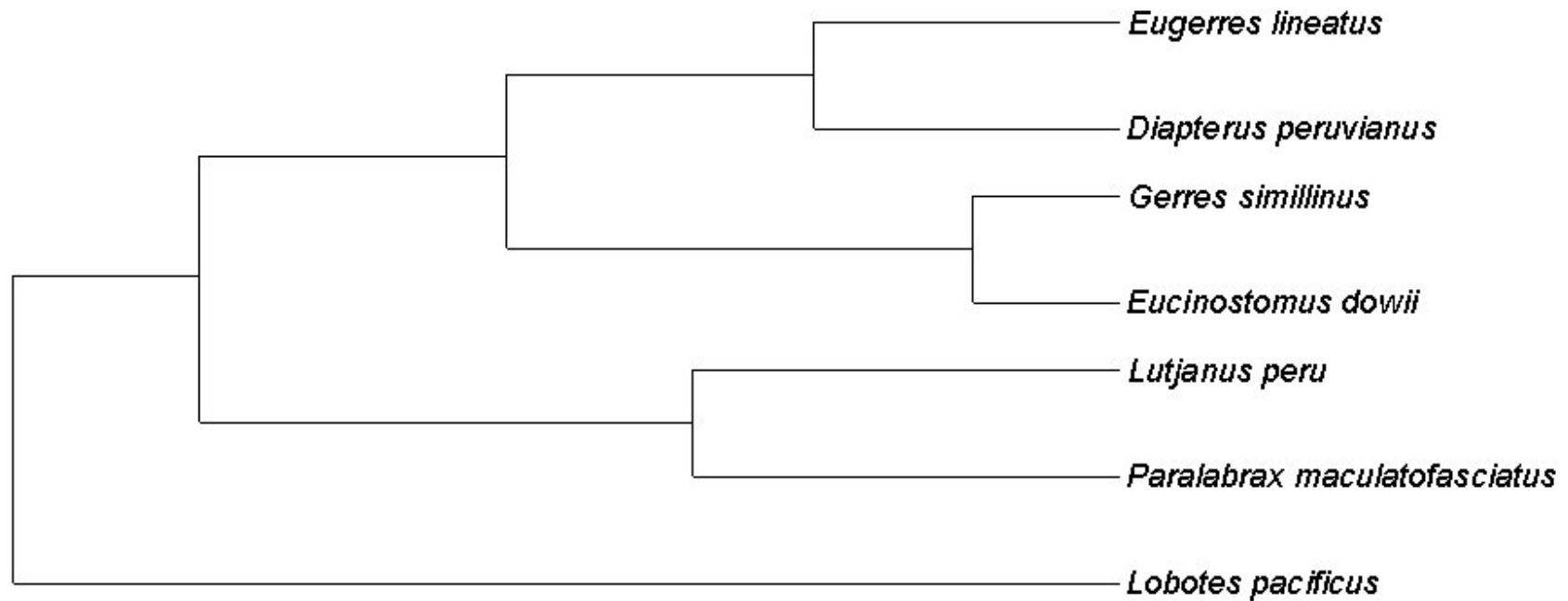


Figura 14. Reconstrucción del árbol mediante el método UPGMA (Uweighted pair group with arithmetic mean) por medio de caracteres moleculares de: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* (Familia Gerreidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae), *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), a partir de la secuencia parcial de la subunidad ribosomal 16S. (Parámetros: distancias de ADN, utilizando la opción de diferencias absolutas, donde los gaps y datos ambiguos se tomaron como datos perdidos Pondella, *et al.* 2003). Árbol enraizado.

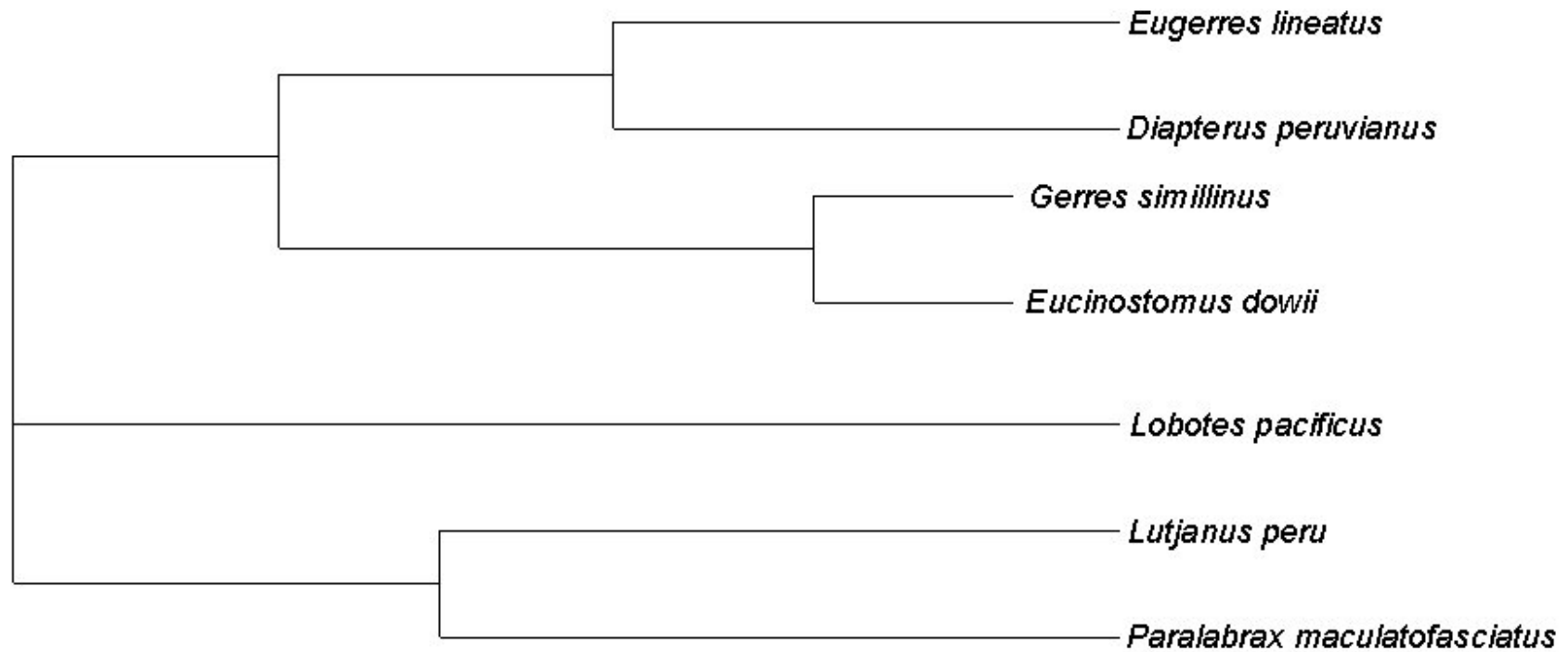


Figura 15. Reconstrucción del árbol mediante el método Neighbor joining (NJ) por medio de caracteres moleculares de: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* (Familia Gerreidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae), *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), a partir de la secuencia parcial de la subunidad ribosomal 16S. (Parámetros: distancias de ADN, utilizando la opción de diferencias absolutas, donde los gaps y datos ambiguos se tomaron como datos perdidos Pondella, *et al.* 2003). Árbol no enraizado.

8. DISCUSIÓN

8.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)

La extracción de ADNg realizada a las muestras recolectadas tanto del medio natural como las obtenidas mediante intercambio (preservadas), con base en el método de “salting-out” mediante el uso de cloruro de sodio saturado, permitió extraer el ADNg solo a las muestras recolectadas del medio natural. Por tal motivo a *Ulaema lefroyi* (fijada en formol), no fue posible extraer el ADN. El trabajo con ADN requiere un producto limpio, libre de contaminantes celulares y solventes orgánicos para evitar que se fragmente (Escorza *et al.*, 1997).

8.2 Amplificación y clonación del fragmento de la subunidad ribosomal 16S

La secuencia de la subunidad ribosomal 16S (ADNr), aislada de los especímenes: *Eugerres lineatus*; *Diapterus peruvianus*; *Gerres simillimus*; *Eucinostomus dowii* (Familia Gerreidae); *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae); *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae); *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), fue clonada para obtener una secuencia de 615 pb en promedio de cada una de las especies, esto es similar con los resultados obtenidos con el mismo marcador y los cebadores propuestos por Palumbi (1996), en el caso de los siguientes grupos taxonómicos: Orden Lampridiformes (Wiley *et al.*, 1998); Orden Pleuronectiformes (Berendzen y Wheaton, 2002) y Familia Serranidae (Craig *et al.*, 2001; y Pondella *et al.*, 2003).

8.3 Análisis de las secuencias del gen 16S

Al comparar el fragmento de la subunidad ribosomal 16S (ADNr), aislada de: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* (Familia Gerreidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae), *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae), con base en los resultados del análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) de la base de datos de GenBank, se corroboró que el fragmento secuenciado corresponde al gen 16S ADNr.

La base de datos del GenBank, permitió comparar las secuencias obtenidas con base en el porcentaje de homología de acuerdo a la proporción encontrada. Las especies de la familia Gerreidae, así como la de la familia Lobotidae presentaron menor coincidencia de nucleótidos y por lo tanto su proporción de identidades fue menor (86%) con respecto a *Lutjanus peru* (96%) y *Paralabrax maculatofasciatus* (95%), debido a que no existen reportes de estos géneros en la base de datos del GenBank, estas secuencias son los primeros informes de *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* (Familia Gerreidae), así como de *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae).

El alto porcentaje de homología presentado por *Paralabrax maculatofasciatus*, se debe a que en la base de datos ya existen informes del género en el GenBank e incluso la misma especie gracias a el trabajo de Pondella *et al.* (2003), lo cual permitió corroborar que el fragmento secuenciado correspondió al fragmento parcial de la región del gen 16S (ADNr). De igual manera para *Lutjanus peru* ya existen reportes del género bajo estudio (Orell, 2000).

8.4 Análisis filogenético

Actualmente no existen propuestas de filogenia molecular dentro de la familia Gerreidae, sin embargo se han realizado estudios dentro del Orden Perciformes, especialmente de las familias Cichlidae, Serranidae, Carangidae y Sparidae (Streelman *et al.*, 1998; Farias *et al.*, 1999; Albertson *et al.*, 1999; Sin-Che y Mung-Pei, 1999; Farias *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 2001; Redd *et al.*, 2001; Orrell *et al.*, 2002; Pondella *et al.*, 2003; Sloss *et al.*, 2004), los cuales permitieron identificar los marcadores genéticos (16S ADNr, 12S ADNr, citocromo b, loci nucleares Tmo-4C4, Tmo-M37) que se han utilizado en la elaboración de filogenias moleculares en peces.

De acuerdo a la literatura y al grupo de estudio, fue seleccionado el marcador genético 16S ADNr, el cual se había probado en la familia Serranidae a nivel genérico por Craig *et al.* (2001), con resultados satisfactorios para el género *Epinephelus*, considerado como un grupo monofilético, a pesar de que los resultados obtenidos no corroboraron las hipótesis previamente propuestas mediante los estudios de filogenia con caracteres morfológicos, permitieron establecer nuevas hipótesis para los géneros: *Epinephelus*, *Cephalopholis* y *Mycteroperca*. Con base en esta evidencia se seleccionó el marcador, tomando en cuenta que una de las especies bajo estudio pertenece a la familia Serranidae. De igual manera Pondella *et al.* (2003), establecieron la filogenia del género *Paralabrax* mediante los genes 16S y 12S, donde la evidencia molecular reveló a este género como el basal de la subfamilia Serraninae, lo que permitió corroborar al gen 16S ADNr como un marcador confiable a nivel de género.

Los estudios realizados con un enfoque morfológico, han establecido las bases de clasificación de la familia Gerreidae (Curran, 1942; Zahuaranec, 1967; Deckert, 1987), quienes separan a los géneros presentes en México mediante la coloración del cuerpo y la presencia o ausencia de aserraciones en los huesos preórbital (=lacrima) y preopercular, y reconocen cinco géneros: *Gerres*, *Eucinostomus*, *Diapterus*, *Eugerres* y *Ulaema*, aunque la relación genealógica en este estudio no puede considerarse resuelta totalmente, ya que no se obtuvo la secuencia de *Ulaema lefroyi*. La reconstrucción del árbol mediante los métodos UPGMA y NJ por medio de caracteres moleculares a partir de la secuencia parcial de la subunidad ribosomal 16S, soportó la monofilia de estos géneros presentes en México.

De La Cruz-Agüero (2001), en su análisis filogenético mediante la utilización de caracteres osteológicos y morfométricos, propuso a *Gerres simillimus* como la especie fraterna de *Eucinostomus*, así como el clado formado por *Eugerres lineatus* y *Diapterus peruvianus* como el grupo más cercano a los taxones anteriores. Esto coincide con la reconstrucción de los árboles con base en caracteres moleculares y permite apoyar tales hipótesis.

Por su parte Ruiz-Carus y Uribe-Alcocer (2002), con base en análisis de aloenzimas y ADN mitocondrial, en *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumeri* y *Diapterus peruvianus*, concluyeron que *Eugerres* y *Diapterus* son grupos filiales; esto confirma la hipótesis filogenética propuesta por De La Cruz-Agüero (2001). Cabe mencionar que aunque no utilizaron el mismo gen para evaluar la filogenia de estos tres géneros, sus resultados coinciden con la reconstrucción de los árboles obtenido en este estudio, donde *Eugerres lineatus* y *Diapterus peruvianus*, se mostraron más cercanas con base a sus similitudes de sus secuencias.

Con base al estudio filogenético de Ortiz-Galindo *et al.* (2002) quienes revisaron la filogenia de las especies selectas de los géneros de la familia Gerreidae, por medio de caracteres morfológicos (merísticos y osteológicos) de periodos iniciales de vida (embrión, larva, juvenil) y de adultos. Encontraron que el grupo de los géneros americanos (*Diapterus*, *Eugerres*, *Eucinostomus*, *Ulaema* y *Gerres*) constituyen la subfamilia Gerreinae y que el genero *Lobotes* persiste como el genero filial de los Gerreidae. Estos resultados coinciden para cuatro de las especies que constituyen la subfamilia Gerreinae con base en la reconstrucción de los árboles por medio de los métodos UPGMA y NJ, sin embargo, *Ulaema lefroyi*, no permitió establecer una hipótesis consistente.

De acuerdo a la evidencia de Ortiz-Galindo *et al.* (2002), los miembros de la familia Lobotidae son el grupo fraterno de la familia Gerreidae. Sin embargo, con la evidencia molecular obtenida no se corrobora a *Lobotes pacificus* como tal, con base al método UPGMA. Cabe mencionar que faltaría incluir en un análisis las especies de *Ulaema lefroyi*, *Parequula melbournensis* y *Pentaprion longimanus*, para establecer una relación genealógica del grupo natural y se establezca una hipótesis tomando datos morfológicos y moleculares.

Con respecto a los grupos externos, constituidos por *Lobotes pacificus*, *Paralabrax maculatofasciatus*, y *Lutjanus peru*, que pertenecen a tres familias de percoideos basales emparentadas con la familia Gerreidae (Nelson, 1994), la reconstrucción por el método UPGMA permitió establecer a *Lobotes pacificus* la menos similar del grupo externo y a *Lutjanus peru* fue la más similar a los representantes de familia Gerreidae.

El método NJ, no permitió establecer alguna relación de similitud con el grupo externo, ya que la topología resultante fue una politomia basal, sin embargo permitió identificar las similitudes de las especies selectas de los géneros de la subfamilia Gerreinae, así como de *Lutjanus peru* y *Paralabrax maculatofasciatus*.

Los caracteres moleculares obtenidos de las secuencias del fragmento de la subunidad del gen 16S ADNr, permitieron la separación de las especies de la subfamilia Gerreinae con respecto al grupo externo, sin embargo, falta analizar el potencial del marcador genético en la resolución de todo el grupo de los Gerreidae.

La información obtenida mediante la utilización de técnicas de biología molecular, son un complemento importante de los estudios sistemáticos, ya que permiten que los datos generados por ambas disciplinas, no solo se tomen de manera independiente, sino que se combinen y puedan establecer filogenias con mayor grado de confiabilidad (Parker, 1997; Banford *et al.*, 1999).

Cabe mencionar que el desarrollo de la sistemática molecular no invalida las hipótesis filogenéticas desarrolladas mediante estudios con caracteres morfológicos y puede ayudar como una herramienta para lograr ciertas interpretaciones, que desde el punto de vista molecular, puedan revelar situaciones donde la variación morfológica es limitada y la homología de rasgos es incierta (Moritz y Hillis, 1996).

De esta manera, el análisis molecular puede permitir el establecimiento de un punto de partida más confiable y desarrollar en un futuro algo que existe y prevalece, el orden jerárquico de los organismos.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron las secuencias de: *Eugerres lineatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres simillimus*, *Eucinostomus dowii* (familia Gerreidae), *Paralabrax maculatofasciatus* (Familia Serranidae), *Lutjanus peru* (Familia Lutjanidae) y *Lobotes pacificus* (Familia Lobotidae) con un producto final de 615 pb en promedio para cada una de ellas.

Estas secuencias de nucleótidos son los primeros informes para la familia Gerreidae, así como para las especies *Lutjanus peru* y *Lobotes pacificus*.

La reconstrucción de los árboles mediante el los métodos UPGMA y NJ, soporta la monofilia de las especies selectas de los géneros de la subfamilia Gerreinae.

10. RECOMENDACIONES

Es importante, que una vez seleccionado el grupo natural bajo estudio, con el fin de elaborar la reconstrucción de la filogenia mediante caracteres moleculares, exista la seguridad de la obtención de los especímenes.

Con el fin de poder contar con material biológico del cual se puedan obtener muestras para hacer la extracción del ADN, es necesario utilizar especímenes frescos o preservados en etanol absoluto o al 70% y mantenerlos en congelación, para asegurar un ADN de buena calidad.

Posteriormente, es necesario identificar el marcador adecuado al estudio planteado, para el diseño y la elaboración de los cebadores, para hacer las pruebas previas y tener la seguridad de una buena amplificación.

11. SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO

Es importante realizar un análisis molecular con el gen 16S de las especies *Ulaema lefroyi*, *Parequula melbournensis* y *Pentaprion longimanus* pertenecientes a esta misma familia, con el objeto de establecer sus relaciones filogenéticas de todo el grupo natural.

Posteriormente, una vez obtenido el estudio evolutivo de toda la familia a nivel genérico, sería recomendable mediante otro tipo de marcador, abordar la problemática a nivel especie, para tener la reconstrucción completa de la familia Gerreidae.

A partir, de los árboles filogenéticos concensados se pueden realizar estudios sobre morfología funcional o el desarrollo de caracteres específicos dentro del grupo.

12. LITERATURA CITADA

Albertson, R., Markert, J., Danley, P. y Kocher, T. 1999. Phylogeny of a rapidly evolving clade: The cichlid fishes of lake Malawi, east Africa. *Evolution*. 96: 5107-5110.

Allen, G. y Robertson, D. 1994. Fishes of the tropical eastern pacific. University of Hawaii Press. 332 pp.

Antuna-Mendiola, A., Castro-Aguirre J. L., De La Cruz-Agüero, y Ortiz-Galindo, J. L.. 2002. Relaciones filogenéticas de las mojaras de la familia Gerreidae (Teleostei:Percoidei) Res. VIII Congr. Nal, Ictiol. Puerto Angel, Oax. 18-22 de Noviembre.

Banford, H., Collette, B. y McCafferty, S. 1999. Phylogenetic systematics of the *Scomberomorus regalis* (Teleostei: Scombridae) species group: molecules, morphology and biogeography of Spanish mackerels. *Copeia* (3): 596-613.

Beredzen, P. y Wheaton, W. 2002. Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence. *Copeia*. (3): 642-652.

Bermingham, E., McCafferty, S. y Martin, A. 1997. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamian Isthmus, pp. 113-128. *In*: Thomas D. Kocher y Carol A. Stepien (Eds.). Molecular Systematics of fishes. Academic Press. San Diego.

Birstein, V., Doukakis, P. y De Salle, R. 2002. Molecular phylogeny of Acipenseridae: nonmonophyly of *Scaphirhynchus chinensis*. *Copeia*. (3): 612-652.

Castro-Aguirre, J.L., Espinoza, Perez, H. y Schmitter-Soto, J.J. 1999. Ictiofauna Estuarino-Lagunar y Vicaria de México.:Editorial, Noriega. 711 pp.

Chávez, J. y Hammann, M. 1989. Dieta de las mojarras, *Gerres cinereus* y *Diapterus peruvianus* (Pisces:Gerreidae) en la Laguna de Cuyutlán, Colima, México, durante verano. *Cien. Mar.* 15(3): 71-80.

Conn, E., Stumpf, P., Bruening, G. y Doi, R. 2001. Bioquímica fundamental. Editorial LIMUSA. México. 736 pp.

Craig, M, Pondella, D., Franck, J. Y Hafner, J. 2001. On the status of the Serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequense molecular. *Phyl. Evol.* (19): 121-130.

Curran, H. W. 1942. A systematic revision of gerreid fishes referred to the genus *Eucinostomus* with a discussion of their distribution and speciation. Disertación Doctoral. University of Michigan. Ann Arbor. 183 p.

Deckert, G. D. 1973. A systematic revision of the genera *Diapterus* and *eugerres*: with the description of a new genus *Schizopterus* (Pisces: Gerreidae). Disertación Maestría en Ciencias. Northern Illinois University. Dekalb, Ill. 74 p.

Deckert, G. y Greenfield, D. 1987. A review of the Western Atlantic species of genera *Diapterus* and *Eugerres* (Pisces: Gerreidae). *Copeia* (1): 182-194.

De La Cruz, J. 2001. Sistemática y biogeografía de las especies del genero *Eucinostomus* (Teleostei:Gerreidae). Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur, México. 125 pp.

Eldredge, N. y Cracraft, J. 1980. Phylogenetic patterns and the evolutionary process. Columbia Univ. Press. New Cork. 349 pp.

Escorza, S., Lux, C. y Costa, A. 1997. Methods of DNA extraction: from inicial tissue preservation to purified DNA storage. MMSC Genetic Special Pub. Society for Marine Mammalogy. 20 p.

Eschmeyer, W. 1998. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences. Vol. I-III: 1-2905.

Farias, I., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H. y Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fase molecular evolution of the neotropical assemblage. *J. Mol. Evol.* 48: 703- 711.

Farias, I., Ortí, G. y Meyer, A. 2000. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. *Mol. Dev. Evol.* 288:76-92.

Fontdevila, A. 1987. Taxonomía y especiación. Ed. Madrid, pp. 77-130 *In: Genética y Acuicultura*. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Eds).

Forey, P. Humpfhries, C., Kitching, I., Scotland, R., Siebert, D. y Williams, D. Cladistics. A practical course in systematics. Oxfor Science Publications. The Systematics Association Publication No. 10. 191 p.

Fry, N., Warwick, S., Saunders, N. y Embley, T. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J. Gen. Micro.* 137: 1215-1222.

Gonzalez-Acosta, A. F. 2004. Revision taxonómica *Eugerres spp.* (Perciformes: Gerreidae) del Atlántico Occidental. Resumen. 4 Semana de Posgrado en Baja California Sur. México.

Gosline, W. 1966. The limits of the fish family Serranidae, with notes on other lower percoids. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 33 (6): 91-112.

Hennig, W. 1968. Elementos de una sistemática filogenética. Manuales EUDEBA, Buenos Aires, Argentina. 353 pp.

Hillis, D., Mable, B., Larson, A., Davis, S. y Zimmer, E. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and cloning. pp. 321-381. *In*: Thomas D. Kocher y Carol A. Stepien (eds). Molecular Systematics. Eds. Sinauer Associates, Inc. USA. Segunda edición.

Johnson, G. 1980. The limits and relationships of the Lutjanidae and associated families. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif.* 24: 1-114.

Navarro, a. y Hernández, B. 1999. Filogenia y clasificación de las aves: una nueva visión, pp. 265-295. *In*: La evolución biológica. Juan Núñez-Farfán y Luis E. Eguiarte. Compiladores. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología. UNAM.

Madison, W., Donoghue, M. y Madison, D. 1984. Outgroup análisis and parsimony. *Sist. Zool.* 33: 83-103.

Masuda, H., K. Amaoka, C. Araga, T. Uyeno y T. Yoshino. 1984. The fishes of the Japanese Archipelago. Tokai Univ. Press. 370 pp.

Meyer, A. 1994. Genetics and evolution of aquatic organisms. Ed. A.R. Bearmant, Chapman y Hall. Londres. 219-249 pp.

Miller, S., Dykes, D. y Polesky, M. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16:12-15.

Moritz, C. y Hillis, D. 1996. Molecular Systematics: Context and controversies, pp. 1-13. *In*: Thomas D. Kocher y Carol A. Stepien (eds). Molecular Systematics. (eds). Sinauer Associates, Inc. USA. Segunda edición.

Morrone, J. 2000. El lenguaje de la cladística. Dirección general de publicaciones y fomento Editorial UNAM. 109 pp.

Morrone, J. 2001. Sistemática, biogeografía, evolución. Las prensas de ciencias, Facultad de Ciencias. UNAM. 124 pp.

Nelson, J. 1978. Ontogeny, phylogeny, paleontology, and the biogenetic law. *Systematic Zoology* 27: 324-345.

Nelson, J. 1994. Fishes of the world. 3rd. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 600 pp.

Orell, T. 2000. A molecular phylogeny of the Sparidae (Perciformes:Percoidei). Disertacion de Doctorado. The faculty of the School of marine Science, Virginia. USA. 277 pp.

Orell, T., Carpenter, K., Musick, J. y Graves, J. 2002. Phylogenetic and biographic analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidei) from cytochrome b sequences. *Copeia* 3: 618-631.

Ortiz-Galindo, J. L., Castro-Aguirre J.L., Antuna-Mendiola, A., Álvarez-González, C.A. y Reynoso-Rosales, V.H. 2002. Relaciones filogenéticas de las mojarra de la familia Gerreidae (Teleostei:Percoidei) Res. VIII Congr. Nal, Ictiol. Puerto Angel, Oax. 18-22 de Noviembre.

Pace, N., Olsen, G., y Woese, C. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*. 45: 325-326.

Parker, A. 1997. Combining molecular and morphological data in fish systematics examples from the Cyprinodontiformes, pp. 163-188. *In*: Thomas D. Kocher y Carol A. Stepien (Eds). Molecular systematics of fishes. Academic Press. San Diego.

Pennisi, E. 1988. Genome data shakes tree of life. *Science*. 280: 672-674.

Pires, I., Schneider, H. y Sampaio, I. 1998. Molecular phylogeny of Neotropical Cichlids: The relationships of Cichlasomies and Heroines, pp. 499-508. *In*: Luiz, R. Malabarba., Roberto E.

Reis., Richard P. Vari., Zilda Margarettes Lucerna y Carlos Alberto S. Lucena (Eds). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Ed. EDIPUCRS. Brasil.

Pondella, D., Craig, M y Franck, J. 2003. The phylogeny of *Paralabrax* (Perciformes:Serranidae) and allied taxa inferred from partial 16S y 12S mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Rev. Mol. Phylo. and Evol.* 29: 176-184.

Reed, D., de Gravelle, M. y Carpenter, K. 2001. Molecular systematics of *Selene* (Perciformes: Carangidae) base don cytochrome b sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 21 (3): 468-475.

Ruiz-Carus, R. y Uribe-Alcocer, M. 2003. Phylogenetic assessment of *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumeri* and *Diapterus auratus* (Pisces:Gerreidae) based on allozyme and mtDNA analyses. *Carib. J. Science.* 39(1): 109-115.

Scott, T., Glover, C. y Southcott, R. 1980. The marine and freshwater fishes of south Australia. D.J. Woolman, Gov. Printer, South Australia. 392 pp.

Schultze, H. y Arratia, G. 1989. The composition of the caudal skeleton of teleosts (Actinopterygii: Osteichthyes). *Zool. J. Limn. Soc.* 97: 189-231.

Shaeffer, B. y Rosen, D. 1961. Major adaptative levels in the evolution of the Actynotperygian feeding mechanism. *Am. Zool.* 1: 187-204.

Sin-Che, L. y Mung-Pei, T. 1999. Molecular Systematics of the Thornfishes genera *Terapon* and *Pelates* (Perciformes: Teraponidae) with referente to the new genus *Pseudoterapon*. *Zoological Studies* 38(3): 279-286.

Sloss, B., Billington, N. y Burr, B. 2004 A molecular phylogeny of the percidae (Teleostei, Perciformes) based on mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phyl. Evol.*. Article in press. 18 p.

Sneath, P. y Sokal, R. 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 573 pp.

Sober, E. 1988. Reconstructing the past. The MIT Press. Cambridge. 256 pp.

Streelman, J., Zardoya, R., Meyer, A. y Karl, S. 1998. Multilocus phylogeny of Cichlid fishes (Pisces: Perciformes): Evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Mol. Biol. Evol.* 15(7): 798-808.

Swofford, D. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, MA.

Villaseñor, J. y Dávila, P. 1996. Breve Introducción a la Metodología Cladística. Coordinación de Servicios Editoriales. Facultad de Ciencias UNAM. 46 pp.

Wiley, E. 1981. Phylogenetics. John Wiley and Sons. New York. 439 pp.

Wiley, E. O. , Siegel-Causey, D., Brooks, D. R., y Funk, V. A. 1991. The complete cladist: A primer of phylogenetic procedures. The University of Kansas Museum of Natural History. Special publication No. 19. 159 p.

Wiley, E., Johnson, D. y Dimmick, W. 1998. The phylogenetic relationship of lampridiform fishes (Teleostei: Acanthomorpha), based on a total-evidence analysis of morphological and molecular data. *Rev. Mol. Phyl. Evol.* 3: 417-425.

Woese, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Zahuranec, B. 1967. The gerreid fishes of genus *Eucinostomus* in the Eastern Pacific. M. Sc. Thesis. San Diego Univ. Calif. 106 pp.

13. ANEXO 1

13. 1 Reactivos y soluciones

NaCl 5M

Agua destilada 800.0ml

NaCl 292.2gr

Aforar un litro con agua destilada y esterilizar en autoclave 20 minutos

Tris EDTA (TE)

10mM Tris HCl (pH 7.4)

1mM EDTA (pH 8.0)

10% SDS

Agua destilada 45ml

SDS 5ml

1M Tris

Agua destilada 400.0

Tris base 60.7

Ajustar pH 8.0, con 21 ml de HCl

Aforar a 500ml con agua destilada y esterilizar en autoclave

Proteinasa K

20mg/ml en agua destilada

Almacenar a -20°C

Ampicilina

50 mg/ml en agua destilada

Almacenar a -20°C

0.5M EDTA pH 8.0

Agua destilada 400.0ml

EDTA 93.5ml

Disolver en placa de agitación magnética

Ajustar pH con NaOH

Esterilizar en autoclave 20 minutos

Medio Luria Bertani (LB)

Agua desionizada 950ml

Bacto triptona 10gr

Extracto de levadura 5gr

NaCl 10gr

Ajustar pH 7.0 con 5N NaOH (~0.2ml)

Aforar a 1litro con agua desionizada

Esterilizar con autoclave por 20 minutos

Medio SOC

Agua desionizada 47.50ml

Bacto triptona 1.00gr

Extracto de levadura 0.25gr

Ajustar pH 7.0, con KCl 250mM (0.93g KCl en 50ml de agua desionizada)

Aforar a 50ml y esterilizar con autoclave por 20 minutos

Dejar a temperatura ambiente y añadir 1ml de glucosa 1M (9gr de glucosa en 45ml de agua desionizada y aforar a 40ml con agua desionizada)

Esterilizar por filtración (filtro de 0.22 micras)

Buffer de lisis (50 ml):

NaCl 5M	1.0 ml	(Concentración final 100 mM)
1M pH 8 Tris	2.5 ml	(Concentración final 50 mM)
0.5 M pH 8 EDTA	2.5 ml	(Concentración final 100 mM)
10% SDS	5.0 ml	(Concentración final 1%)

Aforar a 50 ml con agua desionizada

Proteinasa K 20 mg/ml

NaCl -6M (Solución saturada)

Etanol absoluto

TE