

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biología Ambiental**

---

**Identificación morfológica y molecular de especies de larvas  
de peces del Golfo de México**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**José Manuel Morales Pulido**

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por

**José Manuel Morales Pulido**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**

Directora de tesis

Miembros del comité

**Dra. Sylvia Patricia Adelheid Jiménez Rosenberg**

**Dra. María Clara Arteaga Uribe**

**Dra. Sharon Zinah Herzka Llona**

**Dra. Paola Gabriela Batta Lona**



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**

Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**

Directora de Estudios de Posgrado

*José Manuel Morales Pulido © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **José Manuel Morales Pulido** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biología Ambiental.

### **Identificación morfológica y molecular de especies de larvas de peces del Golfo de México.**

Resumen aprobado por:

---

**Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
**Directora de tesis**

La taxonomía se define como el estudio teórico de la clasificación incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas, cuyo objetivo es organizar la información biológica utilizando diferentes métodos como son el fenetismo, el cladismo, taxonomía evolutiva, etc. En algunos casos para realizar una asignación taxonómica confiable es necesario la integración de varios métodos de identificación, uno de estos casos son los estadios tempranos de vida como las larvas de peces. El objetivo de este trabajo es llevar a cabo la identificación taxonómica de larvas de peces con características externas sutiles (o difíciles de diferenciar), mediante técnicas morfológicas (fenetismo) y moleculares (taxonomía evolutiva); y discernir cuando se requiere de una u otra técnica, o cuando de una combinación de ambas para una identificación precisa de la especie. En el presente estudio se analizaron larvas de peces del género *Bothus* y *Sparisoma* del Golfo de México. Se identificó a los especímenes hasta el nivel taxonómico más alto, con el uso de guías de identificación del Atlántico. Se corroboró la identificación morfológica por medio del uso de los marcadores moleculares 16S y COI. Se realizaron cuadros de distancia genéticas y árboles filogenéticos de 16S y COI. Para la región V9 del 18S, se realizaron árboles filogenéticos con secuencias de peces de diferentes órdenes, para determinar la resolución del marcador. Con la identificación morfológica se logró la discriminación hasta el nivel de género de especímenes del grupo *Sparisoma* y para *Bothus* se logró la discriminación a nivel de especie. Con el uso de los marcadores moleculares se complementó la identificación de especímenes de *Sparisoma*, dando la información necesaria para discriminar a 4 especies de *Sparisoma*. Para las larvas de *Bothus* sólo un organismo fue identificado como *B. ocellatus* y el resto basado en sus secuencias se identificaron como *B. robinsi*. Se observó que la información existente en las guías de identificación no es suficiente para realizar una discriminación al nivel de especie en *Sparisoma* y que no permite discriminar entre *B. ocellatus* y *B. robinsi*. Los marcadores moleculares 16S y COI fueron eficientes en la discriminación a nivel de especie. Sin embargo, los resultados muestran que la región V9 del 18S, no logró una resolución eficiente para la identificación de peces.

**Palabras clave: Bothus, COI, Sparisoma, taxonomía, 16S.**

Abstract of the thesis presented by **José Manuel Morales Pulido** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life's Sciences with orientation in Environmental Biology.

**Morphological and molecular identification of fish's larvae species from the Gulf of Mexico.**

Abstract approved by:

---

**Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Thesis Director

The taxonomy is defined as the theoretical study of biological classification that organizes the information using phenetics, cladistics, evolution taxonomy, etc. In some cases, is necessary to integrate multiple identification techniques to achieve a successful taxonomy assignment, a clear example is the identification of fish larvae. The goal of this research is to carry out the taxonomy identification of fish larvae with subtle characteristics, using morphological techniques (phenetics) and molecular techniques (evolution taxonomy); and determine when is necessary to use one technique or a combination of them for a successfully species identification. *Bothus* and *Sparisoma* larvae from the Gulf of Mexico were analyzed. The larvae were identified to the highest taxonomy level using identification guides of the Atlantic. The morphological identification was corroborated by molecular identification using genetic markers (16S and COI). Phylogenetic trees and genetic distance were calculated for 16S and COI sequences. The resolution of the 18S rRNA V9 region was determined with phylogenetic trees constructed with larvae sequences from differentes orders. The morphology allowed identification to genus level for *Sparisoma* and especie level for *Bothus*. The molecular approach allowed the identification to specie level for four species of *Sparisoma*. The morphological and molecular identification of *B. ocellatus* was corroborated only in one organism, while the other larvae was identified as *B. robinsi*. This study concluded that the information in the identification guides is no enough to discriminate species from *Sparisoma* genus, or to differentiate between *B. ocellatus* and *B. robinsi*. The molecular markers 16S and COI were successfully able to identify larver to species level. The results for the 18 rRNA región V9 show that this marker is no table to achieve enough resolution to identify and assign species.

**Keywords: Bothus, COI, Sparisoma, taxonomy, 16S.**

## **Dedicatoria**

**Para todas las personas buenas y malas que han convivido conmigo, de todas he aprendido  
algo que me hace ser mejor persona**

**Pero especialmente se las dedico a mis papás que son el apoyo incondicional que siempre  
está cuando lo necesito**

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de maestría a través del Programa Nacional del Posgrados de Calidad (PNPC), la cual me permitió continuar con mis estudios e investigaciones. FOLIO 21853 no registro 589119

Al posgrado en Ciencias de la Vida por el apoyo en estancias y congresos.

A CICESE por el uso de sus instalaciones, laboratorios y equipos para la realización de este trabajo.

Al CICIMAR por prestarme sus instalaciones en mis estancias.

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo de SENER-CONACYT Hidrocarburos Proyecto Número 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGOM).

A mi directora Clarissa por apoyarme , por su amistad, por sus enseñanzas y por aceptarme como su alumno en el posgrado. Esto ha hecho que crezca como investigador en diferentes sentidos. También gracias por crear un ambiente de trabajo ameno entre los integrantes del laboratorio. Gracias.

A Paty por enseñarme que las larvas de peces son interesantes y entretenidas, además de que me dedicó mucho tiempo en apoyarme en el trabajo, aunque estuviera a kilómetros de distancia. Se te agradece tu entusiasmo.

Al comité Paty, Sharon, Paola y María por ayudarme en la elaboración de este trabajo, por sus sus observaciones y por dedicarme su tiempo.

A mi grupo de laboratorio más cercano Javi (Xavi), Anaid, Lolis y Clara gracias por el apoyo en todo momento, tanto de trabajo como emocional. Sino fuera por ustedes estaría más loco de lo que estoy y no tuviera una vida tan divertida.

A todo el equipo del laboratorio de Migue, Oscar, Laura, Edgar, Ricardo y muchos más, gracias por ser unos buenos compañeros. Se les agradece que sean personas que no niegan el conocimientos y apoyan a los demás integrantes del equipo.

A la doctora Rufina por apoyarme en los momentos más críticos de mi camino en la maestría.

A mi amiga Ana Laura que siempre estuviste ahí en mis planes locos y espontáneos, por acompañarme en todos los momentos en que lo necesitaba. Te voy a extrañar mucho espero te vaya súper bien y te deseo lo mejor.

A mi amigo Javi que eres el dealer de memes más chido que hay, eres mi camarada y mi profe de laboratorio. Eres bien chido, en serio wey.

A mi amigo Jaime que me apoya mucho académicamente y es buen amigo. Y me escucha en mis momentos de crisis. Muchas gracias Jaime.

A mi mejor amigo Aldo que siempre estás cuando te necesito o simplemente para ir a divertinos. Eres la onda, espero que estes sigas siendo igual en el futuro.

A mi camarada Adán por ser compañero de pokemon go y de fiesta, ya sabes que tendré que ir Mérida a visitarte.

A Elizabeth Aviles, por ser muy simpática y amenizar mi último trayecto de la maestría, muchas gracias.

A los chicos de Ecología, en especial a Gina y Leny por ser mis camaradas de surf.

A mi generación de Ciencias de la Vida.

A Anda Jaleo por ser mi zona de no estrés, gracias Carolina por iniciarme en el flamenco es una de las cosas más cool que me ha pasado. También gracias a mi profa Ale eres de lo mejor, me encanta tu entusiasmo y tu buena vibra. Angela sigue echándole ganas para ser una mejor profa cada día. Gracias Ale Arce, Yessica y Nasla por ser parte de mi primer grupo de Flamenco. Y a todas que hacen de Anda Jaleo una familia.

A los voluntarios de salvavidas de Ensenada. A mi capitana Xoch sólo por ser xalapeña ya eres chida. A Sandra por ser tan comprometida con el grupo, cada vez seremos mejores. Y gracias a todos Loya, Luis Peruano, Vale, Diego , Shunashi y a todos.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	5
1.1.1 Identificación morfológica .....	5
1.1.2 Desarrollo de la técnica del Código de Barras.....	7
1.1.3 Identificación molecular.....	9
1.1.4 Desarrollo de trabajos moleculares para la identificación de peces en México..	11
1.2 Justificación.....	13
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general .....	14
1.4.2 Objetivos específico.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>16</b>
2.1 Identificación morfológica de larvas de peces.....	17
2.1.1 Registro de morfometrías de las especies identificadas.....	19
2.2 Extracción de ADN.....	19
2.3 Amplificación de secuencia.....	20
2.3.1 Amplificación del gen COI.....	20
2.3.2 Amplificación del gen 16S ribosomal.....	20
2.3.3 Amplificación de la región V9 del gen 18S ribosomal.....	21

2.4. Análisis de secuencias amplificada.....	22
2.4.1 Corroboración de identificaciones morfológicas.....	22
2.4.2 Análisis de resolución de secuencias de la región V9 del 18S ribosomal.....	23
2.4.3 Generación y actualización de bases de datos genéticas.....	24
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>25</b>
3.1 Identificación morfológica.....	25
3.1.1 Identificación morfológica de especímenes del género <i>Sparisoma</i> .....	25
3.1.2 Identificación morfológica de especímenes del género <i>Bothus</i> .....	29
3.2 Identificación molecular.....	32
3.2.1 Identificación molecular del género <i>Sparisoma</i> .....	32
3.2.2 Registro de especies de <i>Sparisoma</i> en el área de muestreo.....	35
3.2.3 Identificación molecular del género <i>Bothus</i> .....	36
3.2.4 Registro de especies de <i>Bothus</i> en el área de muestreo.....	37
3.3 Relaciones filogenéticas.....	38
3.3.1 Árboles filogenéticos y cuadros de distancia genética de especímenes de <i>Sparisoma</i> ...	38
3.3.2 Árboles filogenéticos y cuadros de distancia genética de especímenes de <i>Bothus</i> .....	43
3.3.3 Árbol filogenético y asignación taxonómica de secuencias de la región V9 del 18S ribosomal.....	46
<b>Capítulo 4 . Discusión.....</b>	<b>53</b>
4.1 Identificación de especímenes de <i>Sparisoma</i> .....	53
4.2 Identificación de especímenes de <i>Bothus</i> .....	55
4.3 Región v9 del 18S ribosomal.....	57
<b>Capítulo 5 . Conclusiones.....</b>	<b>59</b>
5.1 <i>Sparisoma</i> .....	59
5.2 <i>Bothus</i> .....	60
5.3 Región V9 del 18S ribosomal.....	61

**Literatura citada..... 62**

**Anexos..... 66**

## Lista de figuras

Figura	Página
1 Ejemplo de la morfología de un pez en sus diferentes estadios de desarrollo. Imágenes tomadas de Froese y Pauly (2017).....	3
2 Mapa del Golfo de México donde se muestran los sitios de muestreo del XIXIMI-4. Mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona .....	17
3 Esquema conceptual de las medidas tomadas en los diferentes especímenes de larvas de peces. Longitud estándar (LE), longitud pre anal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), diámetro del ojo (DO) y amplitud máxima (AM). Imagen tomada y modificada de Richards <i>et al.</i> (2006).....	19
4 Diagrama de flujo del proceso de la generación de bases de datos moleculares, que inicia a partir de la identificación morfológicas y culmina en el ingreso de las secuencias a las bases de datos genéticas.....	24
5 Fotografías de los dos morfotipos encontrados en especímenes del género <i>Sparisoma</i> . A) Larva de <i>Sparisoma</i> spp. en estadio de preflexión (el espécimen carece de cabeza) sin el pigmento en la región cardiaca. B) Larva de <i>Sparisoma</i> spp. en estadio de preflexión la cual posee el pigmento en la región cardiaca.....	28
6 Mapa de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes <i>Sparisoma</i> spp. con un cuadro de color rojo. Modificado del mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona.....	29
7 Fotografías de especímenes identificados morfológicamente como <i>Bothus ocellatus</i> . Radios dorsales (RD), radios anales (RA). A) Larva en estadio de preflexión. B) Larva en estadio de flexión. C) Larva en estadio de post-flexión.....	31
8 Mapa de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes <i>B. ocellatus</i> . con un cuadro de color rojo. Modificado del mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona.....	31
9 Fotografías de especímenes de <i>S. atomarium</i> : A) Larva en estadio de preflexión LE = 2.57 mm; B) Larva en estadio de flexión LE= 4.29 mm; C) Larva en estadio de post-flexión LE = 7.94 mm; D) Larva en estadio de post-flexión LE = 5.14. Pigmento cardiaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).....	33
10 Fotografías de especímenes de <i>S. aurofrenatum</i> : A) Larva en estadio de preflexión LE = 2.86 mm; B) Larva en estadio de post-flexión LE= 5.6 mm. Pigmento cardiaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).....	34
11 Fotografías de especímenes de <i>S. chrysopterum</i> : A) Larva en estadio de preflexión LE = 3.53 mm; B) Larva en estadio de post-flexión LE= 3.36 mm. Pigmento cardiaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).....	34

12	Fotografías de especímenes de <i>S. radians</i> : A) Larva en estadio de preflexión LE = 2.39 mm; B) Larva en estadio de flexión LE= 4.29 mm; C) Larva en estadio de post-flexión LE= 8.41 mm. Pigmento cardíaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).....	34
13	Mapas de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes de las cuatro especies de <i>Sparisoma</i> . con un cuadro de color anaranjado. A) Registros de <i>S. atomarium</i> . B) Registros de <i>S. aurofrentaum</i> . C) Registros de <i>S. chrysopterum</i> . D) Registros de <i>S. radians</i> . Modificado del mapa elaborado por la Dra. Paola G.....	35
14	Fotografías de especímenes de <i>Bothus</i> : A) <i>B. robinsi</i> en preflexión LE = 3.28 mm; B) <i>B. robinsi</i> en preflexión LE= 4.35 mm; C) <i>B. robinsi</i> en estadio de flexión LE = 4.12 mm; D) <i>B. robinsi</i> en estadio de post-flexión LE = 5.98 mm; E) <i>B. robinsi</i> en estadio de post-flexión LE = 6.87 mm; F) <i>B. ocellatus</i> en estadio de post-flexión LE = 4.45 mm.....	37
15	Mapa de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes <i>B. ocellatus</i> . con un cuadro de color azul y las estaciones donde se registro a <i>B. ocellatus</i> se marcó con un cuadro rojo. Modificado del mapa elaborado por Paola G. Batta Lona.....	38
16	Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular 16S. El análisis incluye 37 secuencias de los géneros <i>Sparisoma</i> y <i>Lachnolaimus</i> (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank.....	39
17	Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular COI. El análisis incluye 31 secuencias de los géneros <i>Sparisoma</i> y <i>Lachnolaimus</i> (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank y BOLD System es el COI-5P.....	41
18	Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular 16S. El análisis incluye 13 secuencias de los géneros <i>Bothus</i> y <i>Syacium</i> (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank.....	43

- 19      Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular COI. El análisis incluye 31 secuencias de los géneros *Bothus* y *Syacium* (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de maximum likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank y BOLD System es el COI-5P..... 45
- 20      Árbol filogenético de las secuencias de la región V9 del 18S ribosomal. El análisis incluye 42 secuencias de diversos órdenes de peces y el orden Carcharhiniformes (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Jukes-Cantor, la topología se generó a partir del método de maximum likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank..... 47
- 21      Gráfica del porcentaje de identidad y el porcentaje de la asignación taxonómica de cada una de las 76 secuencias generadas para la región v9 del 18S ribosomal con respecto a las secuencias en la base de datos Silva (Versión 128) y Tara Oceans. Cada punto representa una secuencia con un determinado valor de identidad y de confiabilidad (Bootstrap), el color de cada punto representa su asignación dependiendo el nivel taxonómico. Gráfico elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado..... 52

## Lista de tablas

Tabla	Página
1 Primers utilizados en el coctel de Ivanova et al. (2007). Las letras entre paréntesis son los adaptadores M13 que agregaron en su trabajo (* significa que se trata de la referencia original de la secuencia sin adaptador). Tomado y modificado de Ivanova et al. (2007).....	8
2 Caracteres merísticos de especies del género <i>Sparisoma</i> , como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras post-caudales (Richards 2006).....	18
3 Caracteres merístico de especies del género <i>Bothus</i> , como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras pre y post-caudales (Richards 2006).....	18
4 Morfometría de los especímenes analizados de <i>Sparisoma</i> spp.: longitud estándar (LE), longitud preanal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), amplitud máxima (AM) y diámetro del ojo (DO). Los códigos con un "*" son especímenes que fueron identificados molecularmente. N/A: No se logró medir por que el espécimen estaba degradado.....	25
5 Morfometría de los especímenes analizados de <i>Bothus ocellatus</i> .: longitud estándar (LE), longitud preanal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), amplitud máxima (AM) y diámetro del ojo (DO). Los códigos con un "*" son especímenes que posteriormente fueron identificados molecularmente. N/A: No se logró medir por que el espécimen estaba degradado.....	30
6 Número de especímenes identificados molecularmente de <i>Sparisoma</i> por especie y estadio larval.....	33
7 Número de especímenes identificados molecularmente de <i>Bothus</i> por especie y estadio larval.....	36
8 Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular 16S entre especies del género <i>Sparisoma</i> y <i>Lachnolaimus</i> (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.....	40
9 Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular 16S entre especies del género <i>Sparisoma</i> y <i>Lachnolaimus</i> (grupo externo).....	40

10	Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular COI entre especies del género <i>Sparisoma</i> y <i>Lachnolaimus</i> (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.....	42
11	Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular COI entre especies del género <i>Sparisoma</i> y <i>Lachnolaimus</i> (grupo externo).....	42
12	Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular 16S entre especies del género <i>Bothus</i> y <i>Syacium</i> (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.....	44
13	Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular 16S entre especies del género <i>Bothus</i> y <i>Syacium</i> (grupo externo).....	44
14	Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular COI entre especies del género <i>Bothus</i> y <i>Syacium</i> (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.....	46
15	Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular COI entre especies del género <i>Bothus</i> y <i>Syacium</i> (grupo externo).....	46
16	Tabla de la asignación de nivel taxonómico (Reino, Filo, Clase) de 34 secuencias de la región v9 del 18S ribosomal (especímenes previamente identificados) tomando como referencia la base de datos de Silva. Además de mostrar el valor de bootstrap asignado. Cuadro modificado del elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.....	48
17	Tabla de la asignación de nivel taxonómico (Orden, Familia) de las secuencias de la región v9 del 18S ribosomal (especímenes previamente identificados) tomando como referencia la base de datos de Silva y Tara Oceans. Además de mostrar el valor de bootstrap asignado. N/A=No asginado. Cuadro modificado del elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.....	40
18	Tabla de la asignación de nivel taxonómico (Género, Especie) de las secuencias de la región v9 del 18S ribosomal (especímenes previamente identificados) tomando como referencia la base de datos de Silva. Además de mostrar el valor de bootstrap asignado. Cuadro modificado del elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.....	50

19	Caracteres merístico de <i>B. ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> , como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras pre y post-caudales (Evseenko and Nadtoka 2003, Richards 2006).....	56
20	Caracteres merístico de <i>B. lunatus</i> y <i>B. maculiferus</i> , como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras pre y post-caudales (Evseenko and Nadtoka 2003, Richards 2006).....	56

## Capítulo 1. Introducción

---

La taxonomía se define como el estudio teórico de la clasificación incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas, con el objetivo de organizar la información biológica utilizando diferentes métodos como son el feneticismo, el cladismo, la taxonomía evolutiva, entre otros. El método que se utiliza en la taxonomía clásica, también llamada morfológica, es el feneticismo, el cual se basa en la agrupación de organismos utilizando exclusivamente las similitudes de caracteres observables generalmente mediante un valor numérico (Victor 1977, Haro y Melic 1998). Por el otro lado el cladismo se basa en la historia evolutiva y filogenia. Por lo tanto, la agrupación de éstos está definida por las relaciones filogenéticas. La información molecular necesaria para realizar los análisis filogenéticos se puede presentar en varias formas, una de ellas es a través de las secuencias de ADN, con las cuales se ha obtenido de manera eficiente nueva información sobre la historia evolutiva de los organismos (Harley 2009).

La identificación morfológica es una actividad que exige una gran cantidad de tiempo, conocimientos específicos y expertos especializados en determinados grupos taxonómicos para su realización (Packer et al., 2009). Debido a que en ocasiones la identificación morfológica no lograba satisfacer la demanda de información rápida y certera que necesitaban otras líneas de investigación se empezó a infravalorar a la taxonomía en general provocando que en ocasiones se prescindiera de ella (Kim y Byrne 2006, Packer et al. 2009, Ko et al. 2013, Sassa y Hirota 2013, Noriega et al. 2015).

Para aumentar la eficiencia en la identificación en cuestiones de tiempo, certidumbre y generación de información taxonómica, se ha optado por la introducción de metodologías moleculares como complemento de la identificación morfológica (Packer et al., 2009; Wood et al., 2013). Una de las técnicas que se han introducido es la del código de barras de ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta técnica se basa en el uso de secuencias cortas de ADN estandarizadas (marcadores moleculares) que son características de taxones particulares. Dependiendo de su tasa de mutación, pueden generar divergencias entre las secuencias de organismos cercanamente relacionados filogenéticamente permitiendo así su uso para la discriminación entre taxones (Hajibabaei et al., 2007; Ramadan y Baeshen, 2012).

Aunque la identificación molecular ha contribuido en la disminución de tiempo y la certidumbre en la identificación de organismos, también se ha generado un nuevo reto. Este reto es la elaboración de bases de datos genéticas con secuencias abundantes y confiables (Collins y Cruickshank, 2013; Díaz-Viloria et al., 2015).

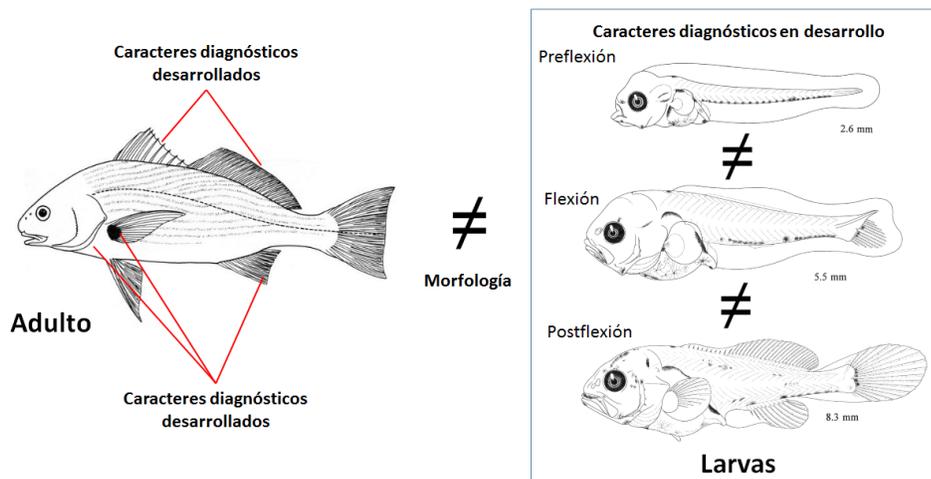
Es necesario tener bases de datos confiables para garantizar la certidumbre de las identificaciones moleculares, y estas deben ser numerosas para realizar la mayor cantidad de identificaciones de taxones posibles. Para lograr este tipo de bases de datos se debe realizar un trabajo en conjunto con la identificación morfológica y molecular, donde la primera da la robustez necesaria para garantizar que las secuencias que se ingresan a las bases de datos coincidan con las especies determinadas, y la segunda ayuda a eficientizar el proceso de identificación de especies en cuestiones de tiempo y certidumbre (Collins y Cruickshank, 2013).

Un grupo de organismos en el cual se ha trabajado con los dos enfoques taxonómicos (morfológico y molecular) son los peces. Tradicionalmente la identificación de estos organismos se ha realizado basándose en sus características morfológicas y merísticas, como por ejemplo, el tamaño, los patrones de pigmentación, además de la disposición de las aletas y de sus elementos contables (Strauss y Bond, 1990). Sin embargo, en ocasiones estos caracteres son insuficientes para discriminar entre especies, debido a que las diferencias morfológicas y merísticas intra-específicas e inter-específicas pueden ser mínimas o incluso indetectables, como es en el caso de las especies crípticas y de las larvas (Teletchea, 2009).

Los peces son un grupo que está integrado por varias especies que son ovíparas, esto implica que estos organismos experimenten una serie de cambios ontogénicos mientras se encuentran en el hábitat. Estos cambios provocan que las larvas presenten una morfología dinámica lo cual dificulta su identificación (Ko et al. 2013). A partir de estos cambios morfológicos se han identificado varios estadios larvales, algunos son el estadio de preflexión, flexión y post-flexión (Fig. 1). El estadio de preflexión inicia cuando la larva absorbe completamente el saco vitelino y termina cuando la flexión de la notocorda inicia; el estadio de flexión inicia cuando la punta de la notocorda inicia su flexión y se forman los principales radios caudales los cuales están soportadas por estructuras óseas, el estadio termina cuando la punta de la notocorda tiene una flexión de aproximadamente 45% con respecto al eje de la notocorda y los principales radios de la aleta caudal están completamente desarrollados; el estadio en post-flexión inicia con la flexión de la punta de la notocorda y la formación de los principales radios de la aleta caudal y concluye con la metamorfosis la cual inicia con la escamación (Kendall et al. 1984).

Independientemente de los cambios morfológicos presentados en los diferentes estadios larvales, la identificación morfológica se dificulta por la pérdida de caracteres diagnósticos en consecuencia de las técnicas de fijación y a claves de identificación limitadas en cuanto número y estadio de desarrollo de los organismos capturados que incluyen (Strauss y Bond 1990, Shulman y Bermingham 1995, Hebert et al. 2003, Zhang y Hanner 2012). Esto representa uno de los principales problemas en la

identificación, descripción y discriminación de especies de peces en sus diferentes estadios larvales (Álvarez-Cadena et al., 2007; Zhang y Hanner, 2012; Díaz-Viloria et al., 2013).



**Figura 1.** Ejemplo de la morfología de un pez en sus diferentes estadios de desarrollo. Imágenes tomadas de Froese y Pauly (2017).

Al no poder realizar identificaciones de organismos a niveles específicos la información necesaria para fines ecológicos, de manejo de recursos, y la implementación de estrategia de protección, etc., se hace menos precisa. En cuestiones de pesquerías existen algunas especies que por una identificación errónea puede provocar un mal manejo de recursos, debido a que no se sabe con certeza que especie se está comercializando, además de impedir que se pueda evaluar el impacto de la explotación sobre las poblaciones (García-Vázquez *et al.* 2009). En Europa, García-Vázquez *et al.* (2009) hicieron una revisión de las identificaciones entre dos merluzas, la *Merluccius bilinearis* y *M. albidus*, que tienen una morfología parecida que puede dificultar la discriminación entre especies. La *M. bilinearis* es una especie explotada comercialmente, mientras que se suponía *M. albidus* tenía poca importancia económica. Al realizar la identificación molecular, se determinó que en realidad ambas especies se estaban explotando. Lo anterior causó que no se tuviera un registro adecuado de ambas especies debido a que todas se estaban registrando como *M. bilinearis* lo cual provocaba un sesgo en las estimaciones del estatus de las poblaciones.

Para tratar de reducir la pérdida de información ocasionada por las limitaciones de las identificaciones morfológicas de los peces, particularmente durante la etapa larvaria, se ha utilizado la técnica de "código de barras de ADN". Los marcadores moleculares que se utilizan predominantemente

como código de barras de ADN son el 18S de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), 16S del ARNr y el citocromo C oxidasa subunidad I (COI) (Hebert et al., 2003; Hajibabaei et al., 2007; Díaz-Viloria et al., 2013; Lv et al., 2014; Wu et al., 2015).

La tasa de mutación mayor del marcador molecular COI en comparación con el 18S y 16S (Zhang y Hanner 2012) le confiere la característica de acumular una mayor variación entre taxones cercanos filogenéticamente, lo cual incrementa la capacidad de identificación en nivel de especie (Hebert et al., 2004b; Wu et al., 2015). El marcador molecular 16S ha demostrado tener la resolución necesaria para realizar identificación en nivel de especie en peces. En ocasiones el 16S no posee la resolución necesaria para realizar identificaciones entre especies muy cercanas filogenéticamente, por lo que es necesario utilizar otro marcador molecular como el COI (Kochzius et al. 2010, Cawthorn et al. 2012).

En el código de barras es altamente recomendable tener ADN íntegro y en buenas condiciones, debido a que las secuencias de los marcadores moleculares 16S y COI son de un tamaño mayor a 500 pb. Sin embargo, en ocasiones tener un ADN en buenas condiciones no es posible, por lo que la capacidad de identificación de estos marcadores moleculares puede afectarse. Para estos casos se pueden utilizar otros marcadores como la región V9 del 18S ribosomal, este marcador se caracteriza por ser una región variable fácil de amplificar debido a su tamaño y estado de conservación. También se tiene que agregar que la región V9 del 18S ribosomal es un marcador que se utiliza en metagenómica, técnica que permite conocer la diversidad de la comunidad a partir de una muestra ambiental y que recientemente ha comenzado a utilizarse para la identificación del zooplancton e ictioplancton (Amaral-Zettler et al. 2009). Debido a la practicidad y potencialidad para ser utilizado en muestras poco conservadas y en estudios metagenómicos, se debe realizar un trabajo para determinar su capacidad de resolución y determinar si puede funcionar como un marcador que pueda funcionar como apoyo de los marcadores moleculares COI y 16S (Wu et al. 2015, Albaina et al. 2016).

La integración de técnicas morfológicas y moleculares de identificación es una forma para realizar identificaciones más confiables y al mismo tiempo generar información que ayude en la identificación de especies con diferentes problemáticas de identificación, como son el género *Sparisoma* y la especie *B. ocellatus*. El género *Sparisoma* posee integrantes con similitudes morfológicas similares que dificulta la identificación en nivel especie de las larvas. Esta problemática se ha visto reflejada en trabajos como el de Houde et al. (1979) y Flores-Coto et al. (2009), los cuáles han resaltado esta problemática al sólo realizar registros en el golfo de México de este taxón (*Sparisoma*) en nivel de género. Por lo anterior se ha visto limitada la información de índole ecológica de este taxón. Por otro lado, otro tipo de problemática durante

la identificación es la dificultad al realizar discriminaciones 100% confiables de larvas entre especies del mismo género, como es el caso de *B. ocellatus* debido al parecido morfológico compartido con otra especie del género *Bothus* (*B. robisni*). Debido a lo anterior, se plantea la necesidad de realizar identificaciones morfológicas y moleculares para determinar si las descripciones morfológicas de las especies son adecuadas para realizar una discriminación, en este caso a nivel de especie de *B. ocellatus* (Evseenko y Nadtoka 2003, Evseenko 2008).

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Identificación morfológica

Uno de los retos de los taxónomos es generar listados de especies que logren representar a la mayor cantidad de organismos existentes en determinadas zonas. En el caso de la ictiología en México se ha tratado de registrar a la mayor cantidad de especies en toda la costa mexicana. El trabajo de Espinosa-Pérez (2014) caracterizó la riqueza específica presente en México. Al realizar una revisión de literatura científica logró determinar que en México hay aproximadamente 2,100 especies de peces, donde la mayor diversidad se encuentra en el Pacífico con 1,121 especies. En lo que respecta a endemismos, el golfo de California posee la mayoría con el 20% del total, mientras que en el golfo de México se encuentran el 15% del país.

La cantidad de información morfológica y ecológica de especies de peces en etapa adulta es amplia en comparación a la existente de especies de etapas larvianas, debido a las dificultades asociadas la identificación taxonómica certera en algunos taxones. Esto ha provocado que trabajos de índole ecológica no obtengan información detallada debido a la dificultad de identificar a las larvas de peces en el nivel de especie. Este es el caso de taxones como *Sparisoma* y *Bothus* donde sus características morfológicas no son suficientes para realizar identificaciones certeras en nivel de especies (Houde et al. 1979, Ditty 1988, Evseenko y Nadtoka 2003, Evseenko 2008, Flores-Coto et al. 2009)

Uno de estos casos es el trabajo de Houde et al. (1979) realizado en las zonas costeras y profundas de la zona oriental del golfo de México. Este estudio buscaba determinar los tipos y abundancias de larvas de peces y huevos, para determinar la importancia del este del Golfo de México, como un área de desove importante para peces. Sin embargo, varios especímenes de larvas de peces sólo se identificaron hasta el nivel de familia (Gobiidae, Labridae y Scaridae, etc.) o se clasificaron como no identificados, esto debido a

la degradación de los especímenes durante el proceso de fijación, a su bajo nivel de desarrollo o a la carencia de descripciones morfológicas. De un total de 143,034 larvas colectadas sólo 59,701 se identificaron en nivel de especie (el 41.7% del total), las cuales correspondieron a 173 especies. Se argumenta que si se hubiera tenido las descripciones morfológicas necesarias se hubiera obtenido registros de especies del doble obtenido.

Ditty (1988) realizó una compilación de trabajos enfocados en el registro de larvas de peces del norte del golfo de México. Se enfocó en determinar la estacionalidad de ocurrencia y distribución en la columna de agua de las larvas peces, para la generación de proyectos en manejo de pesquerías y recreacionales. Observaron que para algunos taxones como los góbidos y los blénidos no se tenían registros en nivel de especie de las fase larvaria. Por lo anterior calcularon abundancias de algunos especímenes en el nivel de género (*Bothus spp.*, *Brevoortia spp.*, y *Fistularia spp.*, etc.).

Uno de los estudios más recientes fue el realizado por Flores-Coto et al. (2009) en el golfo de México ubicado al sur del paralelo 21° N. Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la riqueza de especies de la zona. Utilizaron muestras obtenidas por varios cruceros oceanográficos que fueron realizados entre 1973-2006. De las muestras obtenidas lograron identificar 306 especies, 281 géneros y 120 familias de larvas de peces, pero del total de especímenes recolectados el 16% no se logró identificar a nivel de especie por lo que se registraron a nivel de familia o género. Aunque se logró identificar a una gran diversidad de especímenes a nivel especie, hubo grupos como los de la familia Scaridae donde la información más detallada sólo se logró a nivel de género, lo cual limitó el cumplimiento de los otros objetivos en esos taxones, como eran el cálculo de la abundancia y la determinación de la composición de las comunidades de larvas de peces.

Para el género *Bothus* se han realizado esfuerzos para lograr la discriminación de especies difíciles de identificar como lo son *B. ocellatus* y *B. robinsi*. El trabajo Evseenko y Nadtoka (2003), se enfocó en realizar la revisión de la merística de ambas especies, además de evaluar los caracteres diagnósticos: el número de vértebras, radios dorsales y pterigioforos supracraneales. Se utilizaron especímenes de *B. ocellatus* con una longitud estándar entre 29-125 mm y especímenes de *B. robinsi* con una longitud estándar entre 35.6-105 mm capturados en febrero de 1973 en las aguas de la isla Margarita y del Mar Caribe, además de utilizar también especímenes de colecciones. Se estableció que si una larva presentaba entre 25-26 vértebras post-caudales esta debería considerarse *B. ocellatus* y si un individuo presentaba entre 27-28 vértebras post-caudales se trataba de *B. robinsi* en el 83% de los casos y el 17% restante se conseraba *B. ocellatus*. Se observó que el número modal de los pretigioforos supracraneales presente en

*B. ocellatus* era de 14, mientras que para *B. robinsi* era de 15; estos caracteres tuvieron un éxito de identificación de casi el 100%. Por otro lado, con respecto al número de radios en la aleta dorsal, se observó que la mayoría de los especímenes de *B. robinsi* presentaron un número mayor de 85 radios (33-56 especímenes), mientras que para *B. ocellatus* la mayoría de los especímenes presentaron un número menor a 84 (41 de 50 especímenes). Evseenko y Nadtoka (2003) concluyeron que para realizar la discriminación entre estas especies era necesario utilizar varios caracteres diagnósticos.

### 1.1.2 Desarrollo de la técnica del Código de Barras

Debido a la necesidad de mejorar la robustez en la discriminación de organismos en animales en general se ha ido desarrollando la técnica del código de barras de ADN. El trabajo de Hebert et al. (2003) es importante debido a que estableció al gen citocromo c oxidasa I (COI) como base del sistema de identificación molecular zoológica. Su estudio se enfocó en evaluar la factibilidad de utilizar el COI como una herramienta taxonómica, por lo que una parte del estudio se basó en crear un perfil de los siete phyla más diversos de animales (Annelida, Chordata, Echinodermata, Nematoda, Platelmintos, Arthropoda y Mollusca). Se utilizó el gen COI para reconstruir correctamente las relaciones filogenéticas de los siete phyla y de sus clases más representativas, con lo que se confirmó la capacidad del COI para discriminar entre grupos taxonómicos mayores. También se utilizó el COI para realizar identificación de organismos del orden Lepidóptera, en donde se obtuvo un 100% de certeza en la discriminación de especies, con lo cual se confirmó la factibilidad de utilizar esta secuencia para la identificación en nivel de especie.

El aporte realizado por Hebert et al. (2003) dio a entender del alcance que se podría obtener en cuestiones de identificación al utilizar al gen COI, por lo que el primer paso consistió en el diseño de primers universales que fueran capaces de amplificar a diversos grupos de organismos. Ward et al. (2005) se enfocaron en desarrollar primers "universales" para amplificar las secuencias COI de peces. Ellos diseñaron 4 primers: FishF1: 5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3', FishF2: 5'TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC3', FishR1: 5'TAGACTTCTGGGT- GGCCAAAGAATCA3' y FishR2: 5'ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA3'. Con estos primers se lograron secuenciar 207 secuencias de peces australianos: 3 especies de quimeras, 61 especies de tiburones y rayas, y 143 de teleósteos.

Este grupo de primers tuvo un éxito del 98% en la amplificación de las secuencias. A través de las secuencias se logró discriminar a la mayoría de las especies colectadas y se concluyó que se podría lograr

la identificación individual de huevos, larvas, filetes y aletas de estas especies utilizando el COI. Estos primers han funcionado como base para otros trabajos en donde se ha tratado de diseñar nuevos primers universales para peces como en los trabajos de Ivanova et al. (2007), Ko et al. (2013), Díaz-Viloria et al. (2015), Paine et al. (2007), entre otros.

El trabajo de Ivanova et al. (2007) se enfocó en la modificación de primers previamente publicados en otros trabajos al agregar el adaptador M13 (Messing 1983) (Tabla 1). Los primers modificados fueron los publicados por Ward et al. (2005) e Ivanova et al. (2006). Tres grupos de primers fueron reportados: el COI-1, COI-2 y COI-3 (Tabla I). De estos tres grupos, el grupo COI-3 amplificó bandas con mayor calidad e intensidad y obtuvo el mayor porcentaje de amplificación con un 95.2%, seguido por COI-2 con un 93% y por último COI-1 con sólo un 86%. Por último, se concluyó que estos primers pueden ser capaces de amplificar las secuencias de familias no probadas en este estudio.

**Tabla 1.** Primers utilizados en el coctel de Ivanova et al. (2007). Las letras entre paréntesis son los adaptadores M13 que agregaron en su trabajo (\* significa que se trata de la referencia original de la secuencia sin adaptador). Tomado y modificado de Ivanova et al. (2007)

Nombre	Secuencia de primers 5' 3'	Tamaño del fragmento	Referencias
16S		2974-3546	
16Sar-5'	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	2954-2973	(Palumbi 1996)
16Sbr-5'	CCGGTCTGAACTCAGATCAGGT	3568-3547	(Palumbi 1996)
COI-1		6472-7126	
FF2d	TTCTCCACCAACCACAARGARATYGG	6446-6471	Ivanova et al., (2007)
FR1d	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	7152-7127	Ivanova et al., (2007)
COI-2		6472-7129	
VF1_t1	(TGTA AACGACGGCCAG)TTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG	6446-6471	*Ivanova et al., (2006)
VF1d_t1	(TGTA AACGACGGCCAG)TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG	6446-6471	*Ivanova et al., (2006)
COI-2		6472-7129	
VF1i_t1	(TGTA AACGACGGCCAG)TTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG	6446-6471	*Ivanova et al., (2006)
VR1i_t1	(CAGGAAACAGCTATGAC)TAGACTTCTGGGTGICCIAAIAAICA	7155-7130	*Ivanova et al., (2006)
COI-3		6475-7126	
VF2_t1	(TGTA AACGACGGCCAG)TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	6448-6474	Ward et al., (2005)
FishF2_t1	(TGTA AACGACGGCCAG)TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	6448-6474	Ward et al., (2005)
FishR2_t1	(CAGGAAACAGCTATGAC)ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	7152-7127	Ward et al., (2005)
Frid_t1	(CAGGAAACAGCTATGA)CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	7152-7127	Ivanova et al. (2007)

Continuación. Tabla 1

Nombre	Secuencia de primers 5' 3'	Tamaño del fragmento	Referencias
M13F (-21)	TGTAACGACGGCCAGT		Messing (1983)
M13R (27)	CAGGAAACAGCTATGAC		Messing (1983)

### 1.1.3 Identificación molecular

Paine et al. (2007) se enfocó en la identificación de larvas de la familia Scombridae, para esto, utilizaron secuencias del marcador molecular COI del tejido de adultos previamente identificados, las cuales servirían como base en la identificación de las larvas. Se obtuvieron dos tamaños de secuencias una larga (945 pb) y una corta (264 pb). Observaron que en el fragmento largo había 279 (30%) sitios variables y en el corto 64 (24%) sitios variables. Al comparar las secuencias consenso entre especies, se registró que el número de bases que diferían entre especies en el fragmento largo eran de dos bases (entre *Thunnus obesus* y *T. albacares* o *T. atlanticus*) hasta 152 bases (entre *Scomber scombrus* y *Scomberomorus cavalla*), mientras que en el fragmento corto diferían de una base (*T. obesus* y *T. atlanticus* y entre *Scomberomorus maculatus* y *Scomberomorus regalis*) y hasta 48 bases (entre *Scomber colias* y *Auxis thazard*). Con esto se comprobó la capacidad de resolución del COI en organismos muy cercanos filogenéticamente sin importar el tamaño del fragmento.

De un total de 52 larvas, 18 se lograron identificar a partir de los caracteres morfológicos, tales como el pigmento ventral o la pigmentación del procencéfalo, el resto no se logró identificar debido a la falta de caracteres morfológicos que permitieran discriminar entre especies, por lo que se utilizaron las secuencias obtenidas. Se determinó que el fragmento largo del COI otorgaba mayor resolución para la identificación de especies e incluso permitió identificar las especies a partir de secuencias de tejidos con poca degradación.

Zhang and Hanner (2012) realizaron un trabajo enfocado en comparar la eficiencia de cuatro marcadores moleculares (COI, Cytb, 16S y 18S) en la identificación de peces del mar del sur de China. Determinaron que el marcador con una mayor distancia genética entre especies fue el Cytb seguido por el COI. Aunque el Cytb tuviera un mayor valor en las distancias genéticas, se concluyó que era poco

probable diseñar primers “universales”. En el caso del 16S y 18S tuvieron valores de distancia genéticas muy similares, aunque se observó que el 18S no poseía la resolución necesaria para discriminar entre especies. Con esto se concluyó que el marcador con una mejor resolución en peces del mar del sur de China (sin contar el Cytb) es el COI, seguido por el 16S y por último el 18S.

Por la gran resolución que se ha obtenido en la discriminación de peces con ayuda de los marcadores moleculares, trabajos recientes combinan técnicas morfológicas y moleculares para aumentar la robustez de las identificaciones.

Debido a que se han recolectado varias secuencias de organismos adultos, se ha logrado complementar la identificación morfológica de larvas de peces, un ejemplo es el de Ko et al. (2013). En este trabajo se escogieron 100 morfotipos de larvas de peces que fueron identificados morfológicamente. Las identificaciones morfológicas fueron corroboradas con el marcador molecular COI que fueron amplificados con los primers de Ward et al. (2005). Se llegó a la conclusión de que la identificación morfológica debía ser más conservativa y sólo limitarse a identificar hasta el nivel de familia o género, debido a que la identificación de especies basado en la morfológica presentó un intervalo de error de 66%-97%. Por otro lado, revisaron si el éxito de la identificación molecular disminuía si utilizaban una base de datos tres años anterior al estudio, esto fue con el objetivo de determinar si la base de datos se estaba actualizando. Al realizarse la comparación se observó que con la nueva base de datos se identificaban más taxones que con la antigua base de datos. Con este trabajo se concluyó que las bases de datos genéticas están en constante actualización, lo que permite discriminar más taxones por medio de este método.

Otro marcador utilizado es el 18S, específicamente la región V9. Se trata de un marcador que se ha utilizado para realizar metagenómica en organismos del zooplancton principalmente, pero que debido a sus características se podría utilizar en metagenómicas de peces. El trabajo de Albaina et al. (2016) es uno de los pocos registros de la resolución en peces. Se registró que en tres especies de clupeiformes de diferentes especies (*Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus* y *Sprattus sprattus*), la diferencia entre secuencias era de una a dos pb. Es una parte del trabajo se enfocó en observar la sensibilidad de la metagenómica utilizando este marcador. Para medir la sensibilidad se introdujo ADN de *Engraulis encrasicolus* en diferentes concentraciones (iniciando con 0.005 ng), dentro del contenido estomacal de *Sarsina pilcharuds* y *Sprattus sprattus*. Se logró identificar las secuencias del predador y la presa en todos los casos, por lo que se pudo identificar entre las especies problema en las diferentes concentraciones. Con esto se comprobó que este marcador tiene la resolución necesaria para discriminar entre especies

cercanas filogenéticamente e incluso es eficiente en condiciones donde el ADN está degradado y en bajas concentraciones.

#### **1.1.4 Desarrollo de trabajos moleculares para la identificación de peces en México**

Dentro de los trabajos que identificaron larvas de peces en México se encuentra el de Díaz-Viloria et al. (2013), en este caso se utilizó el marcador molecular 16S, utilizando los primers modificados de Palumbi et al. (2002): 16sar-L: 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3' y 16sbr-H: 5'CCG GTT TGA ACT CAG ATC ACGT 3', se amplificó una fracción de aproximadamente 650 pb del marcador molecular 16S. A partir de estas secuencias se logró la identificación de dos especies de la familia Scianidae: *Totoaba macdonaldi* y *Cynoscion reticulatus* en estadio de preflexión. A partir de las identificaciones moleculares se realizó la descripción morfológica de la especie en el estadio de preflexión, con lo que se determinaron los caracteres diagnósticos para diferenciar a ambas especies. Se tomaron en cuenta el número de miómeros, número de pigmentos y disposición de pigmentos, además de hacer una descripción de la larva en flexión de *C. reticulatus*. Este ha sido uno de los ejemplos de trabajos en los cuales se complementa la identificación morfológica y molecular.

Gracias a la integración de las herramientas moleculares en los trabajos ecológicos, se ha logrado identificar como algunas guías de identificación no poseen las descripciones lo suficientemente detalladas para realizar una identificación a nivel especie en algunos casos. Uno de estos ejemplos es el del género *Engraulis* en el estudio de Díaz-Viloria et al. (2015). Se utilizaron los marcadores moleculares COI y 16S para corroborar la identificación morfológica de *Engraulis mordax*, a partir de muestras obtenidas en el Alto Golfo de California. Las larvas se clasificaron en dos grupos *E. mordax* y Engraulidae tipo 1. Por medio de la identificación molecular, utilizando ambos marcadores moleculares, se corroboró la identificación morfológica de *E. mordax* y se complementó la identificación morfológica de tres especímenes nombrados Engraulidae T1, los cuales se asignaron como *E. mordax*. Al revisar la identificación morfológica de nuevo, se percataron que los caracteres que se describían en la guía de identificación no estaban actualizados, debido a que los especímenes que erróneamente se nombraron Engraulidae T1 presentaban caracteres diferentes a los que se describían. Con este trabajo se complementó la descripción de esta especie, aumentando los caracteres diagnósticos.

En el Golfo de México, pocos han sido los trabajos morfológicos combinados con identificación molecular para la asignación taxonómica en larvas de peces. Valdez-Moreno et al. (2010) realizaron un trabajo en las costas de la península de Yucatán. Se utilizó la técnica de código de barras de ADN para asociar larvas de peces con su estadio adulto. Se secuenciaron 1,392 especímenes de peces marinos, donde se incluían 610 adultos y juveniles, 757 larvas y 25 huevos, los cuales estaban compuestos por 181 especies (179 teleósteos y dos rayas), 136 géneros y 74 familias. De los 610 adultos y jóvenes, 11 no pudieron ser identificados por medios morfológicos debido a la escasa información sobre los caracteres merísticos o el deterioro de los especímenes. En lo que respecta a la identificación molecular 137 de las 757 larvas no fueron identificados con el marcador COI debido a que no existían secuencias que coincidieran en la base de datos BOLD. Se compararon las secuencias de especímenes adultos de la colección de los autores con secuencias de las larvas muestreadas, en total 34 especies de larvas coincidieron con las secuencias de la colección con una divergencia <2%. Calcularon las distancias genéticas de los organismos identificados, los valores entre especies fueron: valor mínimo y máximo de 0% y 3.246% respectivamente, con una media de 0.308% y una desviación estándar de 0.003. Con la identificación molecular se logró obtener información de las temporadas de desove de los especímenes estudiados, además de obtener información merística de larvas con escasa información como las de la familia Gerreidae. Por otro lado, observaron la presencia de larvas con una zona de desove ajena a la costa Yucateca, que fueron transportadas por corrientes. En lo que respecta al género *Sparisoma* y *Bothus* se lograron registros de *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum*, *S. rubripinne*, *S. viride*, *S. radians* y *S. sp.2*; y en el caso del género *Bothus* se identificó a *B. lunatus* y *B. ocellatus*.

Victor et al. (2015) realizaron un listado de especies de peces óseos costeros del oeste del Atlántico en la zona del Gran Caribe, además de incluir la zona del sur Golfo de México y el Sur de Florida. El objetivo de este trabajo fue determinar cuantas especies de las registradas en la lista estaban representadas en la base de datos del BOLD System con al menos una secuencia de COI. De un total de 1311 especies se observó que estaban presentes en la base de datos 1029 (78.5% del total). Lo cual nos indica de que las secuencias COI, tiene información de la mayoría de las especies registradas en la zona.

Con lo anterior se ha determinado que en la bases de datos genéticos pueden tener la información necesaria realizar identificaciones molecular en la zona del sur del Golfo de México, además de que se ha tenido éxito en el incremento de información para realizar descripciones de larvas de peces más detalladas al integrar técnicas de identificación (identificación morfológica y molecular), por lo tanto es posible realizar un estudio donde se analice la capacidad de los marcadores moleculares 16S y COI de identificación de taxones como los géneros *Sparisoma* y *Bothus* y al mismo tiempo generar información

que ayude en la identificación morfológica de estos taxones. Por último, se determinará la resolución en la identificación de peces del nuclear V9 de 18S ribosomal y determinar si es adecuado para este grupo para futuros trabajos metagenómicos o en el caso de obtener muestras de baja calidad.

## 1.2 Justificación

La identificación morfológica ha demostrado tener limitaciones para discriminar algunas especies de peces durante los estadios larvales, principalmente por la dificultad en la identificación entre especies con morfologías similares y la ausencia de descripciones morfológicas. Como consecuencia la generación de información ecológica detallada para ciertas especies es escasa, lo cual limita también a estudios de índole ecológica, a la planeación de programas de manejo en pesquerías, etc.

Gracias a los trabajos que combinan las técnicas morfológicas y moleculares se ha logrado disminuir la incertidumbre en las identificaciones de larvas con morfología similar. Por otro lado, estos trabajos han generado información que ayuda a la realización de descripciones morfológicas más detalladas y a la actualización de las bases de datos genéticas, lo que permite que el éxito de ambas técnicas de identificación se aumente en diferentes taxones.

Para fines de este trabajo se trabajaran con dos taxones con muestras provenientes del golfo de México, para los cuales existen problemáticas en la identificación durante la etapa larvaria. En el primer caso, se trabajará con un grupo de larvas de peces que no es posible identificar a nivel de especie (Género: *Sparisoma*) con base en sus características morfológicas y merísticas. El segundo caso se enfoca en un grupo cuyas características morfológicas puede llevar a una identificación errónea en nivel de especie (*B. ocellatus*).

Por último, se evaluará la resolución para la identificación del marcador molecular V9 del 18S ribosomal, para determinar si es un marcador que pudiera servir como apoyo para los marcadores moleculares 16S y COI, en situaciones donde el ADN no encuentra en buenas condiciones, además de que se pueda utilizar para futuros estudios metagenómicos a partir de muestras ambientales.

### 1.3 Hipótesis

- Si se integran las técnicas de identificación morfológica con las técnicas moleculares, entonces se logrará la generación de información sobre caracteres diagnósticos morfológicos que permitan la discriminación inter-específica en larvas de peces que presenten problemáticas en su identificación, como es el caso de del género *Sparisoma* y *Bothus ocellatus*.
- De acuerdo con la cantidad de información disponible en las bases de datos genéticas y a la tasa de mutación de los marcadores COI y 16S, estos marcadores tendrán una mayor resolución en la identificación de especímenes de peces en comparación al marcador molecular de la región V9 del gen 18S ribosomal.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1. Objetivo general

- Llevar a cabo la identificación taxonómica de grupos de larvas de peces con características externas sutiles (o difíciles de diferenciar), mediante técnicas morfológicas y moleculares para discernir cuál de estas técnicas es más adecuada o si se requiere de una combinación de ambas para una identificación precisa de organismos, como son los organismos del género *Sparisoma* y la especie de *Bothus ocellatus*.

#### 1.4.2. Objetivos particulares

- Identificar hasta el máximo nivel taxonómico posible mediante técnicas morfológicas los diferentes estadios de desarrollo a las larvas de peces del Golfo de México pertenecientes al género de *Sparisoma*.
- Identificar hasta el nivel de especie mediante técnicas morfológicas los diferentes estadios de desarrollo a las larvas de peces del Golfo de México perteneciente a *B. ocellatus*.

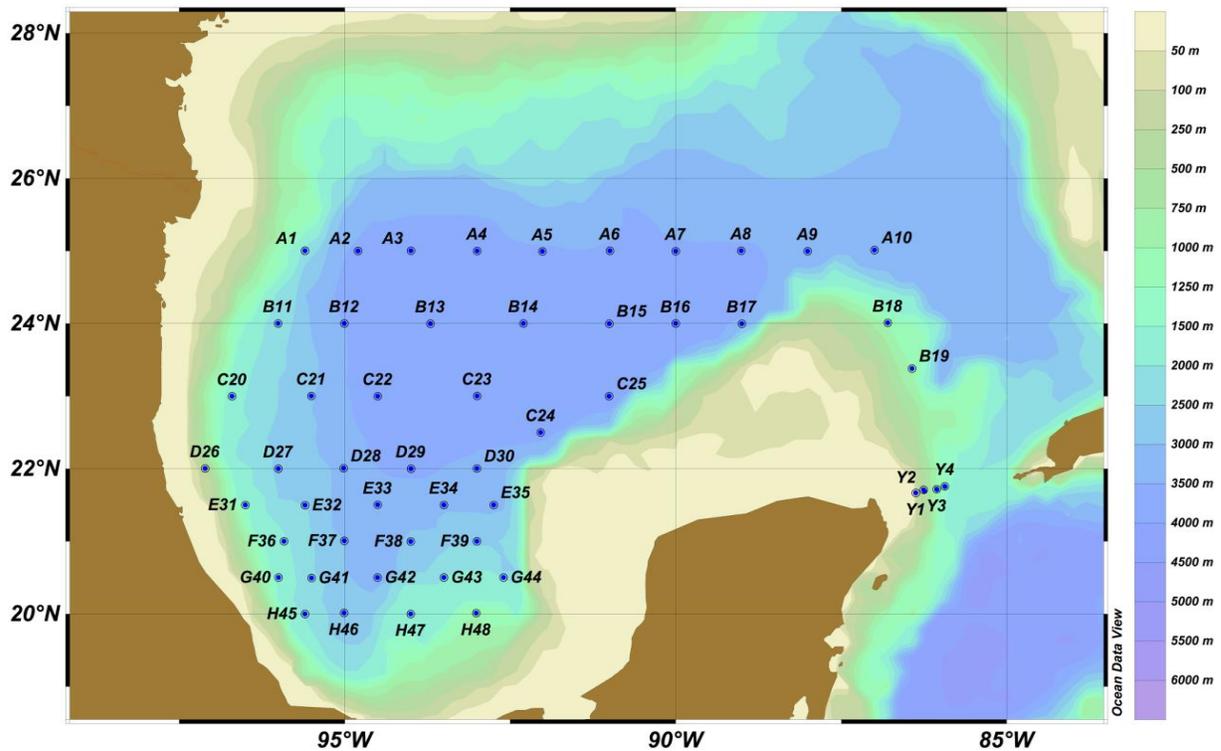
- Corroborar y complementar las identificaciones basadas en la morfología de los especímenes del género *Sparisoma* y de la especie de *B. ocellatus* por medio del uso de la técnica molecular de código de barras de ADN.
- Determinar si los marcadores moleculares COI y 16S son capaces de realizar identificaciones de larvas de peces de especímenes del género *Sparisoma* hasta el nivel de especie.
- Determinar si los marcadores moleculares COI y 16S son capaces de realizar identificaciones de larvas de peces de la especie de *Bothus ocellatus*.
- Determinar hasta qué nivel taxonómico la región V9 del gen 18S ribosomal es capaz de asignar en el grupo de peces.

## Capítulo 2. Metodología

---

Se trabajó con larvas de peces de muestras de zooplancton obtenidas en el Proyecto de diversidad de ictioplancton y zooplancton en el Golfo de México: una aproximación metagenética y taxonómica, patrocinado por el Fondo de SENER-CONACYT Hidrocarburos Proyecto Número 201441. La campaña oceanográfica XIXIMI-4 (Fig. 2) se llevó a cabo entre 27 de agosto al 16 de septiembre de 2015 en el Buque Oceanográfico Justo Sierra de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para la colecta de zooplancton se utilizó una estructura doble tipo bongo, con dos redes con luz de malla de 333  $\mu\text{m}$ , con boca de apertura de 60 cm y copos de colecta. Se realizaron arrastres oblicuos desde la superficie hasta una profundidad máxima de 200 m, siguiendo la metodología de Smith y Richardson (1977). Las muestras obtenidas en una de las redes fueron concentradas en frascos de medio litro y fijadas etanol al 96%, con recambio a las 48 horas.

Una vez en el laboratorio, la biomasa zooplanctónica de cada muestra se estimó por medio del método de volumen “húmedo” desplazado, excluyendo los organismos considerados no planctónicos, como peces juveniles y adultos, calamares y pulpos grandes, cangrejos pelágicos adultos, así como medusas y tunicados de tallas mayores, cuyo volumen individual excedía los 5 ml. Posteriormente se procedió a la separación las larvas de peces del resto de los organismos de la muestra.



**Figura 2.** Mapa del Golfo de México donde se muestran los sitios de muestreo del XIXIMI-4. Mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona

## 2.1 Identificación morfológica de larvas de peces

Las larvas de peces se separaron en morfotipos (grupo de individuos morfológicamente diferenciados de una especie no identificada o sin significancia taxonómica) que pertenecieran a los géneros *Sparisoma* y *Bothus*. Con base en claves y esquemas de bibliografía especializada (Fahay 1983, Evseenko y Nadtoka 2003, Richards 2006, Evseenko 2008), para especies de peces registrados en la zona de estudio. En el caso de los especímenes de *Sparisoma* la identificación morfológica se llegó a género. Los caracteres merísticos no fueron suficientes para lograr una identificación a nivel de especie (Tabla 2).

**Tabla 2.** Caracteres merísticos de especies del género *Sparisoma*, como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras post-caudales (Richards 2006).

Especie	Dorsal	Pectoral	Pélvica	Anal	Caudal	Vértebras
<i>S. atomarium</i>	IX-10	13	I, 5	III, 9	7+6	25
<i>S. aurofrenatum</i>	IX-10	13	I, 5	III, 9	7+6	25
<i>S. chrysopterum</i>	IX-10	13	I, 5	III, 9	7+6	25
<i>S. radians</i>	IX-10	13	I, 5	III, 9	7+6	25
<i>S. rubripinne</i>	IX-10	13	I, 5	III, 8-9	7+6	25
<i>S. viride</i>	IX-10	13	I, 5	III, 9	7+6	25

Con base en las características merísticas se identificaron las larvas pertenecientes a *B. ocellatus* (Tabla. 3).

**Tabla 3.** Caracteres merístico de especies del género *Bothus*, como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras pre y post-caudales (Richards 2006).

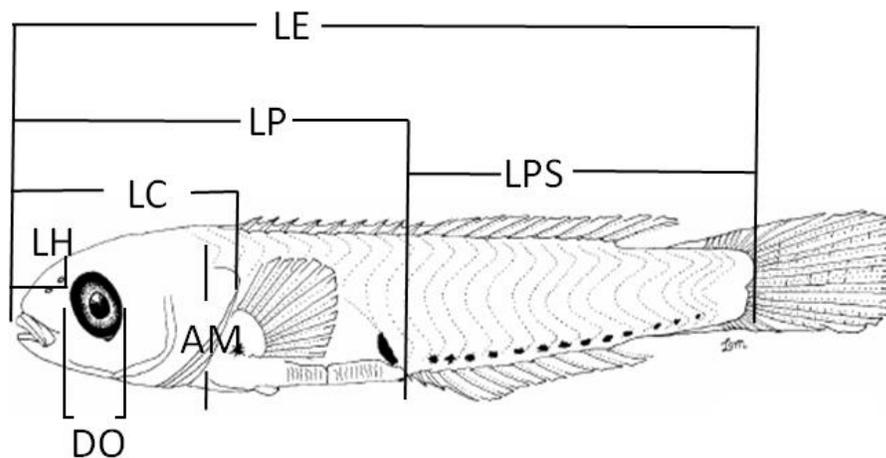
Especie	Dorsal	Pectoral	Pélvica	Anal	Caudal	Vértebras precaudales	Vértebra post-caudales
<i>B. lunatus</i>	91-99	10-2	6	71-76	17	10	30
<i>B. maculiferus</i>	90-98	8-10	6	70-76	17	10	29-30
<i>B. ocellatus</i>	76-91	8-10	6	58-68	17	10	26(25-27)
<i>B. robinsi</i>	78-90	8-11	6	59-68	17	10	27(26-28)

Simultáneamente a la identificación se registró el número de individuos por especie, estación de muestreo y estadio de desarrollo. Para asignar los estadios de desarrollo, se utilizó el método propuesto por Ahlstrom et al. (1976), tomando en cuenta la base de la flexión de la notocorda en el caso de las larvas, dividiendo al desarrollo en tres estadios: preflexión, que inicia desde que la larva a consumido su reserva vitelina, hasta el inicio de la flexión de la notocorda; flexión, que continua de la preflexión y culmina con la flexión total de la notocorda, cuando los elementos primarios de la aleta anal se han desarrollado, y post-flexión, inmediato al estadio de flexión, culminando cuando la larva ha desarrollado todos los elementos de las aletas.

### 2.1.1 Registro de morfometrías de las especies identificadas

Para cada espécimen se obtuvieron mediciones morfológicas (Fig. 3) tomando las medidas de longitud estándar (LE), longitud preanal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), amplitud máxima (AM) y diámetro del ojo (DO). Se registró la merística de los especímenes teniendo en cuenta el número de miómeros totales, preanales y post-anales, además del número de radios y espinas de las aletas dorsales, anales y caudal. También, se registró del patrón de pigmentación tomando en cuenta la distribución y número de pigmentos presentes en las diferentes regiones del cuerpo.

Cada una de las larvas fue fotografiada en ambos planos laterales y a cada foto se le asignó una clave que las asociara con el espécimen.



**Figura 3.** Esquema conceptual de las medidas tomadas en los diferentes especímenes de larvas de peces. Longitud estándar (LE), longitud pre anal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), diámetro del ojo (DO) y amplitud máxima (AM). Imagen tomada y modificada de Richards *et al.* (2006).

## 2.2 Extracción de ADN

Se extrajo el ojo del plano lateral derecho de las larvas (en caso necesario se extrajo el ojo del plano lateral izquierdo o la cabeza entera) y para la homogenización se utilizó el kit de extracción de ADN DNeasy Blood & Tissue kits QIAGEN (Anexo A). El ADN se re suspendió en 20µL de buffer AL. Para verificar que el ADN estuviese íntegro y de buena calidad las extracciones se analizaron en geles de agarosa. Las fotos se tomaron en un fotodocumentador marca BIO-RAD ChemiDoc™ MP Imaging System, modelo Universal Hood III.

## 2.3 Amplificación de secuencias

### 2.3.1 Amplificación del gen COI

En la amplificación gen COI en *Bothus* se utilizaron los primers descritos por Ward et al. (2005): FishF1: 5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC3', FishF2: 5'TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC3', FishR1: 5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA30; se obtuvieron productos aproximados de 650 pb. Las reacciones de PCR fueron una mezcla total de 20  $\mu$ L compuesta de 11.275  $\mu$ L de agua ultrapura, 4  $\mu$ L de buffer de PCR (5X), 2.8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 Mm) ,0.4  $\mu$ L de dNTP's (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L de *Taq* polimerasa (5 U), 2  $\mu$ L de ADN de concentraciones entre 12 ng a 41 ng (Concentraciones finales. Anexo B). El programa del termociclador consistió en un paso inicial de 2 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 0.5 min a 94°C, 0.5 min a 54°C, y 1 min a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C y un paso de espera a 4°C .

En el género *Sparisoma* no se logró amplificar secuencias de COI con los primers de Ward et al. (2005), por lo que se utilizaron los primers descritos por Leray *et al.* (2013): mIColintF: 5'GGWA CWGG WTGA ACWG TWTA YCCY CC 3', mIColintR: 5'GGRG GR TA SACS GTTC ASCC SGTS CC3'; se obtuvieron productos aproximados de 313 pb. Las reacciones de PCR fueron una mezcla total de 25  $\mu$ L compuesta de 15.88  $\mu$ L de agua ultrapura, 5  $\mu$ L de buffer de PCR (5X), 1.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 Mm) ,0.5  $\mu$ L de dNTP's (10  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 0.125  $\mu$ L de *Taq* polimerasa (5 U), 1  $\mu$ L de ADN de concentraciones entre 20 ng a 50 ng (Concentraciones finales. Anexo C). El programa del termociclador consistió en un paso inicial de 1 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 10 seg a 94°C, 0.5 min a 54°C, y 1 min a 72°C, seguido por 5 minutos a 72°C y un paso de espera a 4°C.

### 2.3.2 Amplificación del gen 16S ribosomal

Para la amplificación del gen 16S ribosomal se usaron los primers de Díaz-Viloria et al. (2013): 16 sar-L: 5'CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT3', 16 sbr-H: 5'CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T3'. Las condiciones de temperatura, tiempo y concentraciones de reactivos fueron las descritas por Díaz-Viloria et al. (2013). Las reacciones de PCR fueron una mezcla total de 20  $\mu$ L compuesta de 11.6  $\mu$ L de agua ultrapura, 4  $\mu$ L de buffer de PCR (5X), 1.6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 Mm), 0.8  $\mu$ L de dNtp's (10  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L de Go *Taq* Promega polimerasa, 2  $\mu$ L de ADN (Concentraciones finales. Anexo D). El programa del

termociclador consistió en un paso inicial de 2 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 53°C, y 1 min a 72°C, seguido por 4 minutos a 72°C y un paso de espera a 4°C. Se esperaba obtener un amplicón de aproximadamente 650 pb.

### 2.3.3 Amplificación de la región V9 del gen 18S ribosomal

Para la amplificación se de la región V9 del 18S ribosomal se utilizaron especímenes identificados morfológicamente y/o molecularmente de los órdenes Gadiformes, Myctrophiformes, Perciformes, Ophidiiformes, Pleuronectiformes, Scorpaeniformes, Stomiiformes y Tetraodontiformes.

En el PCR de la región V9 del 18S ribosomal, se utilizaron los primers descritos en Amaral-Zettler et al. (2009): 1389F: 5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG TTG TAC ACA CCG CCC3' Y 1510: 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GCC TTC YGC AGG TTC ACC TAC3'. Las condiciones del PCR que se utilizaran, es resultado de la modificación de las condiciones descritas por Amaral-Zettler et al. (2009). Las reacciones de PCR fueron una mezcla total de 20 µL compuesta de 11.3 µL de agua ultrapura, 4 µL de buffer de PCR (5X), 2.4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 Mm), 0.4 µL de dNtp's (10 µM), 0.4 µL de cada primer (10 µM), 0.1 µL de *Taq* polimerasa, 1 µL de ADN (Concentraciones finales. Anexo E). Las condiciones del programa del termociclador consistieron en un paso inicial de 3 min a 95°C seguido por 30 ciclos de 0.5 min a 95°C, 0.5 min a 57°C, y 0.5 min a 72°C, seguido por 5 minutos a 72°C y luego un paso de espera a 4°C . Se esperaba obtener un amplicón de aproximadamente 121 pb.

Para evaluar si los amplicones obtenidos fueron íntegros y eran los esperados se corrieron un gel al 2% a un voltaje y tiempo determinado por el tamaño del gel. Las amplificaciones obtenidas se enviaron a secuenciar a los laboratorios SEQXCEL INC., en San Diego California. Las secuencias resultantes se introdujeron a una base de datos perteneciente al CICESE y al GenBank.

## 2.4 Análisis de secuencias amplificadas

### 2.4.1 Corroboración de identificaciones morfológicas

Se utilizó el programa Geneious 4.8.4. para evaluar la calidad de las secuencias forward obtenidas de COI, 16S y región V9 del 18S ribosomal. Posteriormente se utilizó el programa Mega 7.0.2 para realizar alineamiento por medio de Clustal W. A partir de este alineamiento se procedió a eliminar los extremos de las secuencias que no tuvieran buena calidad. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) el GenBank (Benson et al. 2012). Para el alineamiento se utilizó la herramienta de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), que se encuentra en la página de NCBI.

La identificación molecular se validó de acuerdo con los valores de E-value, porcentaje de cobertura y similitud, se buscaba que el valor de E-value fuera 0, la cobertura fuera mayor de 80%, que los valores de similitud fueran entre 98-100%, para realizar la asignación taxonómica. En el caso que no se cumplieran estos requerimientos mencionados, se realizaría una corroboración con la identificación de otro marcador molecular.

Se realizaron árboles filogenéticos para dar mayor robustez a las identificaciones moleculares. Con ayuda del programa Mega 7.0.2. se determinó cual era el modelo de sustitución de nucleótidos apropiado para las secuencias. Con la opción de "Find Best DNA/Protein Model" el programa calculó el valor de el Criterio Bayesiano de Información (BIC) el cual indica que modelo se adapta mejor a las secuencias ingresadas, y se calculó el Criterio de información de Akaike (AIC) el cual indica que modelo es que menor información pierde. El modelo de sustitución determinado como el más adecuado para las secuencias de 16S y COI de los géneros *Sparisoma* y *Borthue* fue Kimura 2 parámetros. Los árboles filogenéticos se generaron con el programa Mega, a partir del método de "Maximun likelihood", el soporte de la ramas se calculó con el método de Bootstrap (3000 iteraciones). Para enraizar los árboles filogenéticos se utilizaron secuencias de especies de familia diferentes a los estudiados, pero que fueran los más cercano filogenéticamente posible, para *Bothus* se utilizó la secuencia de un representante de la familia Pleuronectidae y para *Scaridae* se utilizó una secuencia de la familia Labridae.

Debido a que las secuencias de la región V9 del 18S ribosomal son escasas en las bases de datos genéticas en lo que respecta a los peces, se trabajó sólo con secuencias generadas en el laboratorio de

genómica funcional del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), patrocinado con el fondo de SENER-CONACYT Hidrocarburos Proyecto Número 201441.

Con el programa DnaSP 5.10.1. (Librado y Rozas 2009) se identificaron la cantidad de polimorfismos existentes entre las secuencias intra e inter específicamente de los especímenes identificados molecularmente. Se utilizaron tres secuencias por especie para realizar la comparación, en dado caso que las secuencias generadas de este trabajo no eran suficientes, se agregaron secuencias provenientes de la base de datos de COI.

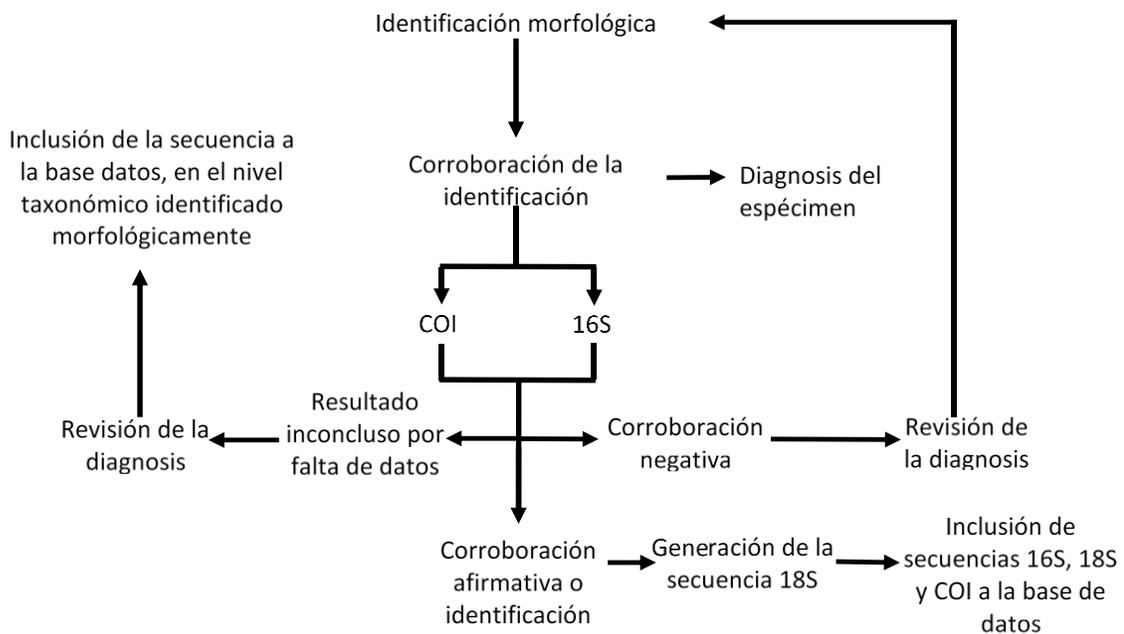
Con la corroboración o corrección de las identificaciones morfológicas, se hicieron mapas ubicando cada uno de los especímenes en las estaciones donde fueron muestreados para tener un registro de las especies en la zona.

#### **2.4.2 Análisis de resolución de secuencias de la región V9 del 18S ribosomal**

Para el análisis para determinar la resolución de la región V9 del 18S ribosomal, se utilizaron secuencias de especímenes de diferentes ordenes (Perciformes, Pleuronectiformes y Stomiiformes los cuales fueron identificados molecularmente con los marcadores moleculares COI y/o 16S) previamente identificados por taxónomos del CICIMAR-IPN de la Paz Baja California. El análisis Bioinformático lo realizó un integrante del equipo de Bioinformática del CICESE, el cuál colabora con el proyecto CIGOM. Las secuencias se introdujeron al programa de Mothur y se siguió el pipeline de Kozich et al. (2013) omitiendo los pasos de curado. Se alinearon con las secuencias de la base de datos de referencia de Silva high quality ribosomal RNA databases (<https://www.arb-silva.de/>) con el método de (Wang et al. 2007). La asignación se realizó con ayuda de RDP tomando de referencia la base de datos de Tara Oceans (<https://www.embl.de/tara-oceans/start/>). Se generaron tablas de asignación de las secuencias generadas (Reinos, filo, clase, familia, género y especie). También se realizó un gráfico para observar la confianza de la asignación de cada nivel taxonómico, a través del método estadístico de Boostsap.

### 2.4.3 Generación y actualización de bases de datos genéticas

Para enriquecer las bases de datos genéticas (GenBank y la base de datos del CICESE), todas las secuencias generadas (COI, 16S y la región V9 del gen 18S) siguieron el procedimiento que se ilustra en la fig.4



**Figura 4.** Diagrama de flujo del proceso de la generación de bases de datos moleculares, que inicia a partir de la identificación morfológicas y culmina en el ingreso de las secuencias a las bases de datos genéticas.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1. Identificación morfológica

Se trabajaron con 106 larvas en diferentes estadios larvales: preflexión, flexión o post-flexión, además hubo seis casos de especímenes en estadio de transformación. El grupo total de larvas estaba integrado por representantes del género *Sparisoma* (Familia Scaridae) y del género *Bothus* (Familia Bothidae).

#### 3.1.1. Identificación morfológica de especímenes del género *Sparisoma*

Se identificaron 72 larvas en el nivel de género de *Sparisoma* spp basándose en la morfología de los especímenes. Las larvas presentaron diferentes estadios de desarrollo: ocho larvas en preflexión, 20 en flexión, 40 en postflexión y cuatro en transformación. Se registraron longitudes estándar de larvas en preflexión desde 2.39 mm hasta 3.53 mm, en flexión desde 2.43 mm hasta 6.38 mm, post-flexión desde 2.68 mm hasta 8.59 mm y transformación desde 5.14 mm hasta 8.21 mm (Tabla 4).

**Tabla 4.** Morfometría de los especímenes analizados de *Sparisoma* spp.: longitud estándar (LE), longitud preanal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), amplitud máxima (AM) y diámetro del ojo (DO). Los códigos con un “\*” son especímenes que fueron identificados molecularmente. N/A: No se logró medir por que el espécimen estaba degradado.

Especie	Código	Estadio	LE	LPA	LC	LH	DO	AM
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-21*	Preflexión	3.53	1.86	0.84	0.42	0.23	0.65
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-26	Preflexión	2.75	0.96	0.72	0.24	0.24	0.52
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-27*	Preflexión	2.72	1.43	0.39	N/A	N/A	0.57
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-47*	Preflexión	2.57	1.34	0.44	N/A	N/A	0.47
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-48*	Preflexión	2.86	1.67	0.52	N/A	N/A	0.67
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-49*	Preflexión	2.69	1.73	0.84	N/A	N/A	0.66
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-50*	Preflexión	2.39	1.24	0.38	0.14	0.14	0.38
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-51*	Preflexión	2.67	1.48	0.43	0.14	0.14	0.43
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-22*	Flexión	3.29	1.67	0.52	0.10	0.19	0.52
<i>Sparisoma</i> spp.	LGM-29*	Flexión	4.70	2.51	0.90	0.26	0.26	0.82

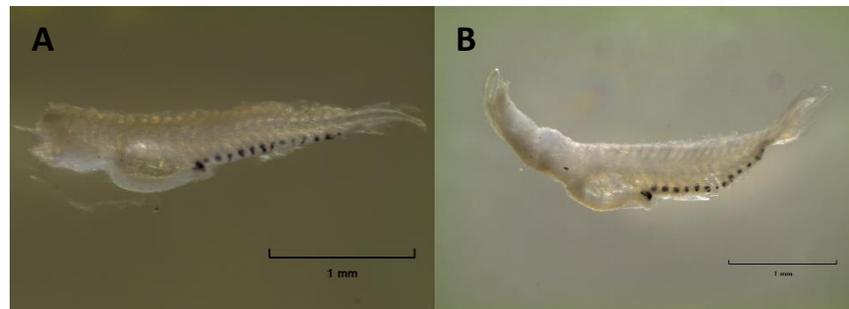
Continuación. Tabla 4.

Especie	Código	Estadio	LE	LPA	LC	LH	DO	AM
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-33	Flexión	3.25	1.80	0.62	0.17	0.18	0.64
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-53*	Flexión	5.97	2.91	0.77	0.38	0.23	0.77
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-74*	Flexión	3.73	1.84	0.62	0.29	0.23	0.46
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-76	Flexión	4.56	1.54	0.58	0.22	0.21	0.51
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-77	Flexión	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.66
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-79	Flexión	6.38	3.33	1.1	0.42	0.28	0.8
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-82	Flexión	4.50	2.54	0.93	0.29	0.24	0.72
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-87	Flexión	5.04	2.62	1.09	0.28	0.27	0.90
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-88*	Flexión	4.17	2.13	0.79	0.33	0.23	0.75
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-90	Flexión	4.56	2.64	1	0.40	0.24	0.77
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-104*	Flexión	2.43	N/A	0.44	0.19	0.19	0.29
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-108*	Flexión	4.29	2.14	0.62	0.28	0.39	0.66
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-109*	Flexión	3.83	2.25	0.76	0.42	0.33	0.68
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-114	Flexión	4.74	2.45	0.68	0.48	0.23	0.68
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-115	Flexión	3.83	1.95	0.68	0.40	0.25	0.68
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-116	Flexión	3.57	1.90	0.68	0.39	0.26	0.70
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-117	Flexión	4.29	2.19	0.95	0.48	0.79	0.48
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-118*	Flexión	6.03	3.1	1.01	0.48	0.48	0.97
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-16*	Post-flexión	5.6	3.27	0.9	0.24	0.24	1.02
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-19*	Post-flexión	6.07	3.27	1.30	0.46	0.31	1.30
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-23*	Post-flexión	3.36	1.96	0.84	0.38	0.23	0.69
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-24*	Post-flexión	8.41	4.39	1.76	0.77	0.46	1.76
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-25*	Post-flexión	8.59	4.67	1.92	1.23	0.54	1.69
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-26*	Post-flexión	2.75	0.96	0.72	0.24	0.24	0.52
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-28	Post-flexión	5.23	2.80	1.15	0.31	0.31	1.07
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-30*	Post-flexión	5.19	2.65	0.90	0.28	0.27	0.87
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-31*	Post-flexión	5.62	2.50	0.91	0.41	0.21	0.93
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-32*	Post-flexión	5.08	2.67	0.97	0.25	0.27	0.93
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-35*	Post-flexión	6.16	3.27	1.15	0.61	0.23	1.23
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-39*	Post-flexión	3.24	1.76	0.57	0.19	0.15	0.46
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-40*	Post-flexión	4.53	2.48	0.86	0.33	0.19	0.91
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-41	Post-flexión	3.29	1.76	0.43	0.14	0.14	0.67

Continuación. Tabla 4.

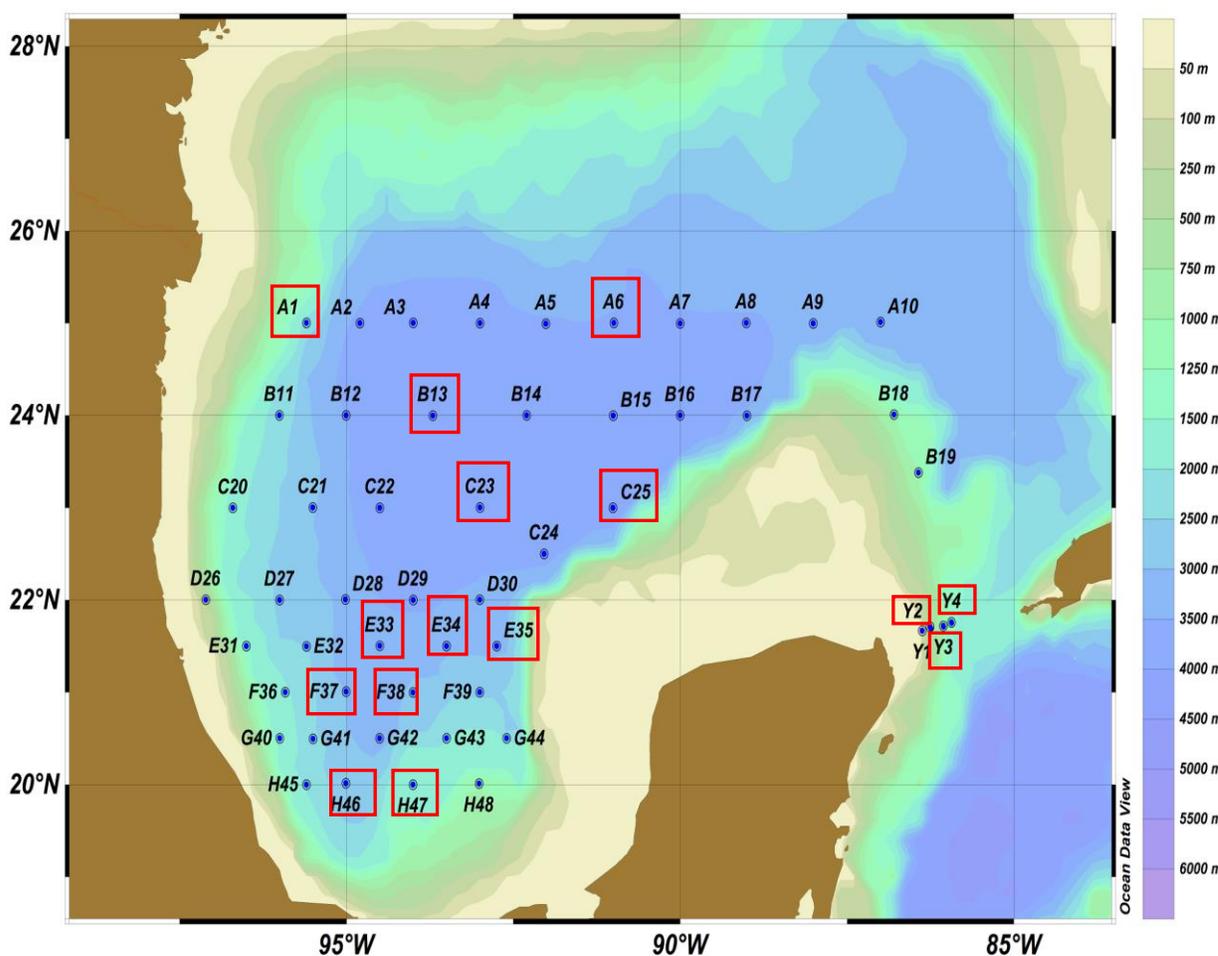
Especie	Código	Estadio	LE	LPA	LC	LH	DO	AM
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-42	Post-flexión	2.68	1.48	0.40	N/A	N/A	0.45
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-43	Post-flexión	2.91	1.56	0.49	0.13	0.13	0.45
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-44	Post-flexión	3.26	1.97	0.63	0.18	0.18	0.63
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-45	Post-flexión	8.34	3.95	1.92	0.58	0.66	1.34
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-46	Post-flexión	5.78	2.59	1.12	0.32	0.29	1.17
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-54*	Post-flexión	7.94	4.39	1.31	0.56	0.37	1.68
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-70	Post-flexión	6.79	3.76	1.09	0.45	0.30	1.27
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-71	Post-flexión	4.44	2.54	0.62	0.34	0.22	0.69
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-72	Post-flexión	6.97	3.62	1.33	0.49	0.44	1.34
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-73	Post-flexión	6.63	3.62	1.26	0.45	0.40	1.09
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-75	Post-flexión	6.14	3.27	1.09	0.36	0.32	1.20
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-78	Post-flexión	4.25	2.24	0.72	0.24	0.23	0.71
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-80	Post-flexión	6.58	3.72	1.2	0.47	0.39	0.82
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-81	Post-flexión	6.54	3.53	1.05	0.39	0.29	1.17
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-83	Post-flexión	4.27	2.48	0.83	0.25	0.23	0.82
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-84	Post-flexión	5.56	3.21	1.05	0.37	0.32	1
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-85	Post-flexión	4.15	2.14	0.72	0.32	0.23	0.80
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-86	Post-flexión	4.22	1.97	0.84	0.36	0.23	0.64
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-89	Post-flexión	6.47	3.43	1.40	0.43	0.33	1.2
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-91	Post-flexión	5.63	2.98	0.91	0.37	0.27	0.9
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-92	Post-flexión	5.40	2.83	0.92	0.25	0.22	1.01
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-93	Post-flexión	4.32	2.33	0.74	0.25	0.25	0.73
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-105	Post-flexión	6.35	3.25	0.87	0.58	0.39	0.78
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-107	Post-flexión	4.43	2.24	0.62	0.23	0.19	0.50
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-110	Post-flexión	3.90	2.22	0.68	0.39	0.42	0.37
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-111	Post-flexión	4.28	N/A	0.71	0.47	0.30	0.47
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-57*	Transformación	5.14	2.69	0.96	0.60	0.30	1.02
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-106	Transformación	8.03	4.53	1.66	1.07	0.52	0.99
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-112	Transformación	7.43	3.95	1.19	0.76	0.48	1.19
<i>Sparisoma spp.</i>	LGM-113	Transformación	8.21	4.67	1.76	1.14	1.53	0.78

Todos estos especímenes presentaron la característica merística más evidente a nivel de familia: 25 miómeros totales (10 preanales y 15 post-anales). Todas las larvas presentaron la pigmentación características del género *Sparisoma*: 13 pigmentos ventrales post-anales, un pigmento lateral en forma de parche sobre el ano en el intestino. Por último, se asignaron dos morfotipos a partir de la presencia de un pigmento a la altura de la aleta pectoral en la región cardiaca, 71 de las 72 larvas presentaron el pigmento (Fig. 5).



**Figura 5.** Fotografías de los dos morfotipos encontrados en especímenes del género *Sparisoma*. A) Larva de *Sparisoma* spp. en estadio de preflexión (el espécimen carece de cabeza) sin el pigmento en la región cardiaca. B) Larva de *Sparisoma* spp. en estadio de preflexión la cual posee el pigmento en la región cardiaca.

Se registró la distribución de las larvas dentro de la zona de muestreo. Se observó que la mayoría de las larvas en preflexión se localizaron en la estación C25, mientras que las 3 larvas restantes se ubicaron en las estaciones Y2 y Y4. Las estaciones con un mayor número de larvas en flexión fueron la E33 y E34 con 4 y 3 larvas respectivamente, mientras que las estaciones con una mayor presencia de larvas en estadio de post-flexión fueron la A8 y E33 con 6 y 7 larvas respectivamente (Fig. 6).



**Figura 6.** Mapa de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes *Sparisoma* spp. con un cuadro de color rojo. Modificado del mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona.

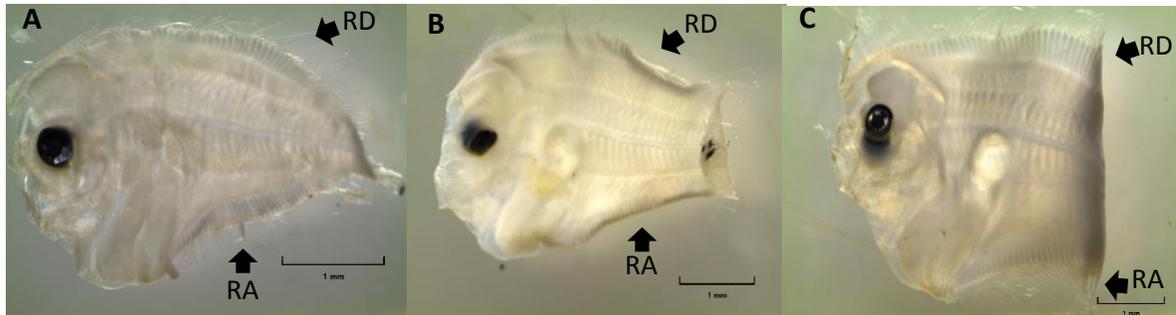
### 3.1.2.- Identificación morfológica de especímenes del género *Bothus*

Se identificaron 34 especímenes del género *Bothus*, presuntamente *Bothus ocellatus* según las características morfológicas y merísticas presentada en Richards (2006). Se registraron larvas en los cuatro estadios de desarrollo: 17 especímenes en preflexión, uno en flexión, 19 en post-flexión y dos en transformación. Las longitudes estándar variaron: en preflexión desde 1.47 mm hasta 4.35 mm, en flexión se registró un espécimen de 4.12 mm, post-flexión posee medidas que van desde 3.75 mm hasta 9.26 mm y transformación desde 8.22 mm y 9.98 mm (Tabla 5).

**Tabla 5.** Morfometría de los especímenes analizados de *Bothus ocellatus*.: longitud estándar (LE), longitud preanal (LP), longitud post-anal (LPS), longitud cefálica (LC), longitud del hocico (LH), amplitud máxima (AM) y diámetro del ojo (DO). Los códigos con un “\*” son especímenes que posteriormente fueron identificados molecularmente (Anexo G). N/A: No se logró medir por que el espécimen estaba degradado

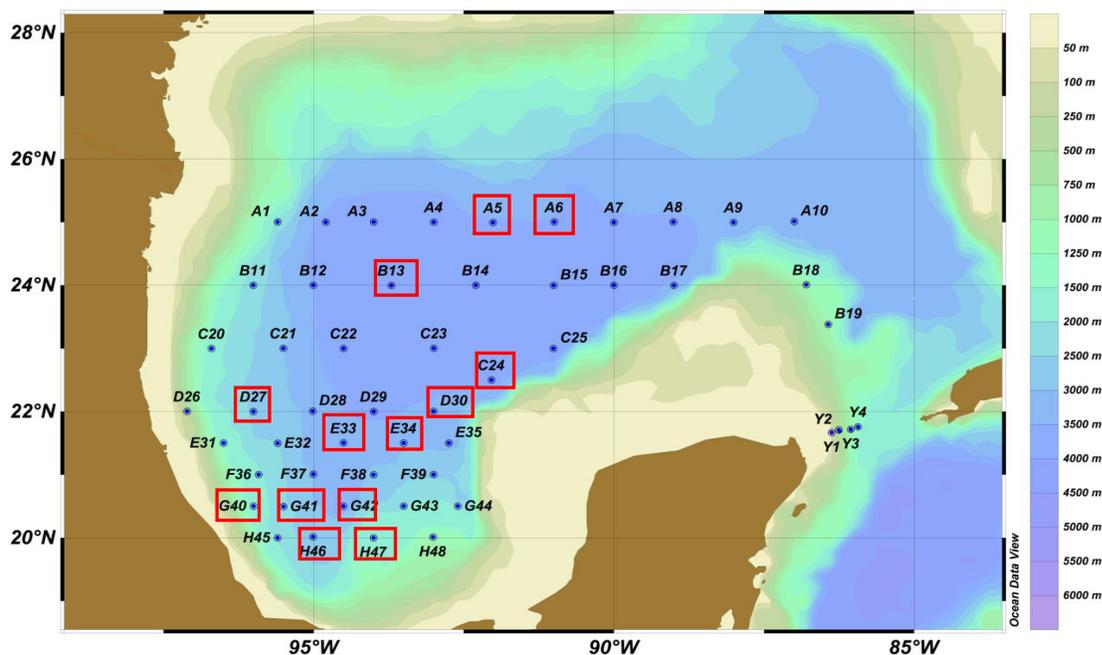
Especie	Código	Estadio	LE	LPA	LC	LH	DO	AM
<i>B. ocellatus</i>	LGM-11*	Preflexión	1.47	0.57	0.40	0.17	0.093	0.55
<i>B. ocellatus</i>	LGM-12*	Preflexión	2	1.33	0.85	0.29	0.25	0.93
<i>B. ocellatus</i>	LGM-58*	Preflexión	5.26	1.50	0.30	0.42	0.30	2.51
<i>B. ocellatus</i>	LGM-67	Preflexión	3.91	1.22	0.83	0.23	0.25	1.67
<i>B. ocellatus</i>	LGM-96*	Preflexión	4.35	1.73	1.23	0.42	0.34	2.68
<i>B. ocellatus</i>	LGM-103*	Preflexión	3.28	1.82	0.94	0.29	0.36	1.63
<i>B. ocellatus</i>	LGM-120*	Preflexión	4.20	2.11	1.20	0.46	1.82	0.29
<i>B. ocellatus</i>	LGM-121	Preflexión	N/A	1.68	0.93	0.24	1.81	0.35
<i>B. ocellatus</i>	LGM-124	Preflexión	3.52	0.84	1.08	0.23	0.33	2.28
<i>B. ocellatus</i>	LGM-126	Preflexión	2.47	1.51	1.03	0.42	0.28	2.09
<i>B. ocellatus</i>	LGM-127*	Preflexión	N/A	N/A	N/A	0.35	0.25	2.34
<i>B. ocellatus</i>	LGM-128	Preflexión	2.94	1.11	0.97	0.41	0.25	1.93
<i>B. ocellatus</i>	LGM-101*	Flexión	4.12	1.41	1.20	0.46	0.39	2.84
<i>B. ocellatus</i>	LGM-13*	Post-flexión	3.75	N/A	1.34	0.43	0.34	2.69
<i>B. ocellatus</i>	LGM-14*	Post-flexión	4.45	1.79	1.15	0.42	0.30	2.89
<i>B. ocellatus</i>	LGM-60*	Post-flexión	5.98	1.59	1.21	0.47	0.37	3.92
<i>B. ocellatus</i>	LGM-61	Post-flexión	6.35	1.96	1.40	0.47	0.37	4.20
<i>B. ocellatus</i>	LGM-62*	Post-flexión	6.54	1.96	1.59	0.65	0.37	4.11
<i>B. ocellatus</i>	LGM-63*	Post-flexión	5.98	2.34	1.49	0.47	0.37	3.46
<i>B. ocellatus</i>	LGM-64	Post-flexión	6.63	1.96	1.49	0.56	0.37	4.30
<i>B. ocellatus</i>	LGM-65	Post-flexión	7.66	2.34	1.96	0.56	0.47	4.39
<i>B. ocellatus</i>	LGM-94*	Post-flexión	8.30	2.11	2.30	0.90	0.53	6.21
<i>B. ocellatus</i>	LGM-95	Post-flexión	N/A	N/A	1.51	0.46	0.42	3.35
<i>B. ocellatus</i>	LGM-97	Post-flexión	9.26	3	1.85	0.68	0.56	6.79
<i>B. ocellatus</i>	LGM-98	Post-flexión	7.01	2.28	1.83	0.60	0.46	3.93
<i>B. ocellatus</i>	LGM-99	Post-flexión	N/A	N/A	N/A	0.46	0.33	4.22
<i>B. ocellatus</i>	LGM-100*	Post-flexión	6.87	1.94	1.68	0.63	0.45	4.78
<i>B. ocellatus</i>	LGM-102*	Post-flexión	8.55	2.78	2.31	0.63	0.52	6.48
<i>B. ocellatus</i>	LGM-125	Post-flexión	5.08	2.05	1.38	0.61	0.40	3.94
<i>B. ocellatus</i>	LGM-130*	Post-flexión	5.85	1.87	1.73	0.55	0.43	3.71
<i>B. ocellatus</i>	LGM-68	Transformación	8.22	1.49	1.87	0.65	0.47	5.51
<i>B. ocellatus</i>	LGM-69	Transformación	9.98	1.41	2.35	0.59	0.47	7.63

Como características merísticas sobresalientes, los especímenes presentaron entre 35-38 miómeros totales: 10 preanales y 25-29 post-anales. Los organismos en postflexión tenían entre 76-90 radios en la aleta dorsal, entre 60-68 radios en la aleta anal y en la aleta caudal 17 radios (Fig. 7).



**Figura 7.** Fotografías de especímenes identificados morfológicamente como *Bothus ocellatus*. Radios dorsales (RD), radios anales (RA). A) Larva en estadio de preflexión. B) Larva en estadio de flexión. C) Larva en estadio de post-flexión.

La estación E33 presentó la mayor número de larvas en preflexión (3 larva), en el caso de la larva en flexión se registró en la estación G40 y para las larvas en post-flexión la estación con mayor número de larvas fue la H47 con 7 (Fig. 8).



**Figura 8.** Mapa de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes *B. ocellatus*, con un cuadro de color rojo. Modificado del mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona.

## 3.2.- Identificación molecular

Se hicieron identificaciones moleculares con los marcadores moleculares COI y 16S para los especímenes de *Sparisoma* spp. y *B. ocellatus*. Del género *Sparisoma* se secuenciaron 30 secuencias del marcador molecular 16S (aprox. 518 pb) y para las secuencias COI (aprox. 253 pb) amplificadas con los primers de Leray et al. (2013) se secuenciaron ocho (aprox. 508 pb). En el caso de *B. ocellatus* se secuenciaron ocho secuencias del marcador 16S (536pb) y para el COI (578 pb) con los primers de Ward et al. (2005) se secuenciaron 17 secuencias.

### 3.2.1.- Identificación molecular del género *Sparisoma*

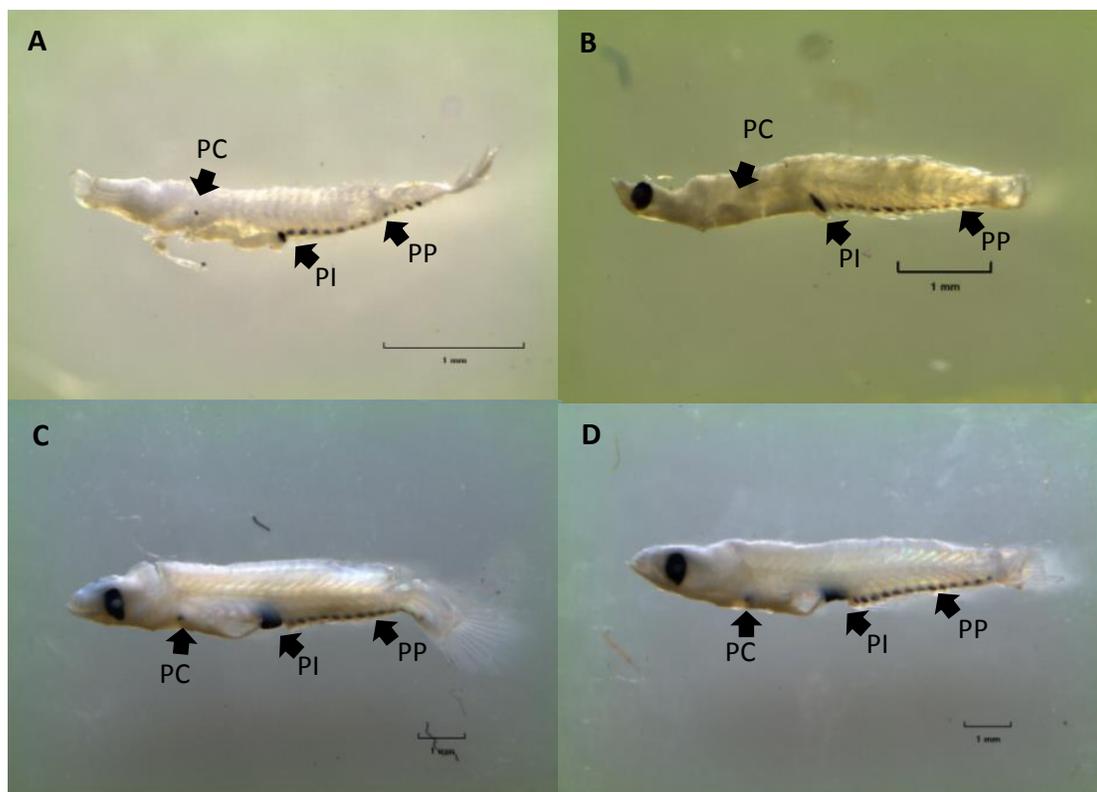
Morfológicamente se identificaron 77 larvas pertenecientes al género *Sparisoma*, sin embargo se llevó a cabo la identificación molecular de 30 larvas (se identificaron todos los especímenes en estadio de preflexión y flexión). De los 30 especímenes siete se presentaban en estadio de preflexión, nueve en flexión, 13 en post-flexión y uno en transformación. La identificación molecular de los 30 especímenes se realizó en nivel especie con base del análisis de las secuencias del marcador molecular 16S. Se identificaron cuatro especies: *S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians*. Las identificaciones se corroboraron con el análisis de las secuencias del marcador molecular COI de 2 especímenes por especie (8 secuencias).

Los alineamientos de las secuencias del marcador molecular 16S generados de los especímenes del género *Sparisoma* con las secuencias del GenBank, indicaron valores estadísticos de porcentaje de identidad entre el 99%-100%, además de obtener valores de e-value de 0 y valores de cobertura entre 98%-100%, lo cuál da robustez a las identificaciones. En los alineamientos de las 8 secuencias del marcador molecular COI generadas con las base del NCBI, los dos alineamientos de la especie identificadas como *S. radian* indicaron un valor de porcentaje identidad de 96 y 97% , valores de e-value de 0 y valores de porcentajes de cobertura 100%. En los alineamientos de las dos secuencias de los especímenes identificados como *S. aurofrenatum* indicaron valores de porcentaje de identidad de 96% y 98%, e-value de 0 y porcentajes de cobertura de 100%. El resto de los alineamientos indicaron valores de *aurofrenatum* indicaron valores de porcentaje de identidad entre 98%-9%, e-value de 0 y porcentajes de cobertura entre 98-100% (Anexo H e I).

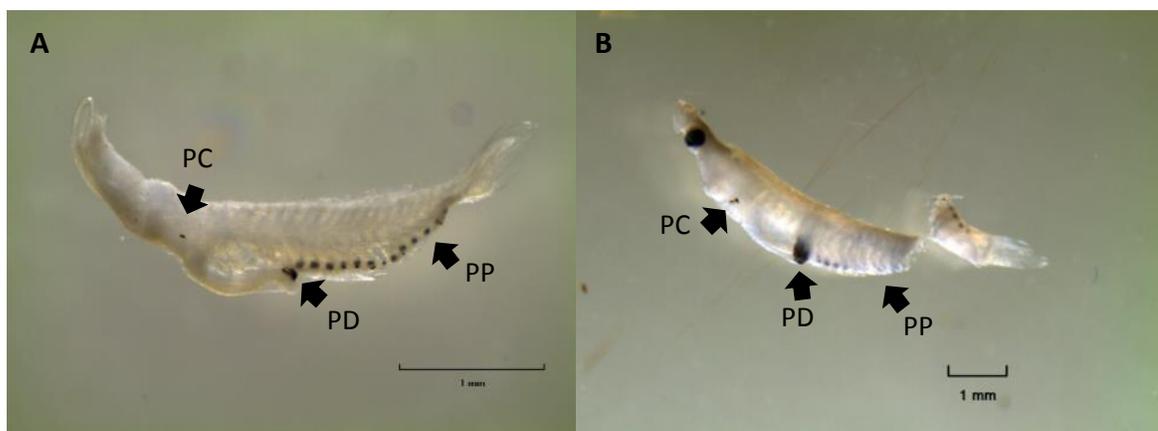
Se identificaron 16 especímenes de *S. atomarium* (Fig. 9), además se registró al menos un espécimen por estadio larval (preflexión, flexión y post-flexión, además de transformación), para *S. radians* (Fig. 12) se identificaron 10 especímenes y se registró al menos un espécimen por cada estadio larval, para *S. aurofrenatum* (Fig. 10) y *S. chrysopterum* (Fig. 11) se identificaron dos y tres especímenes respectivamente y se registró al menos un espécimen para los estadios de preflexión y post-flexión (Tabla. 6). Todos los especímenes presentaron los mismos caracteres morfológicos.

**Tabla 6.** Número de especímenes identificados molecularmente de *Sparisoma* por especie y estadio larval.

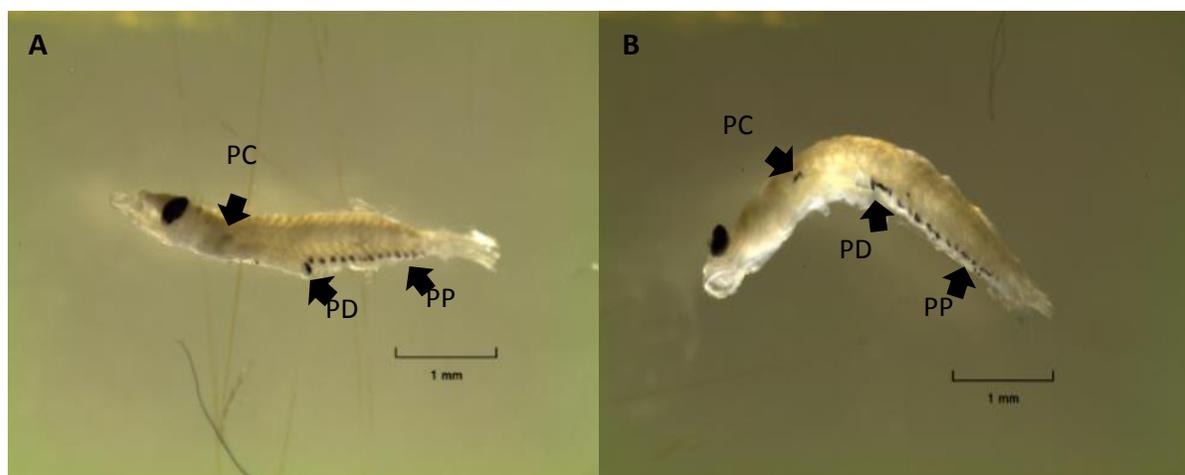
Especie	Preflexión	Flexión	Post-flexión	Transformación	Total
<i>S. atomarium</i>	4	3	8	1	16
<i>S. aurofrenatum</i>	1	0	1	0	2
<i>S. chrysopterum</i>	1	0	2	0	3
<i>S. radians</i>	1	6	2	0	9



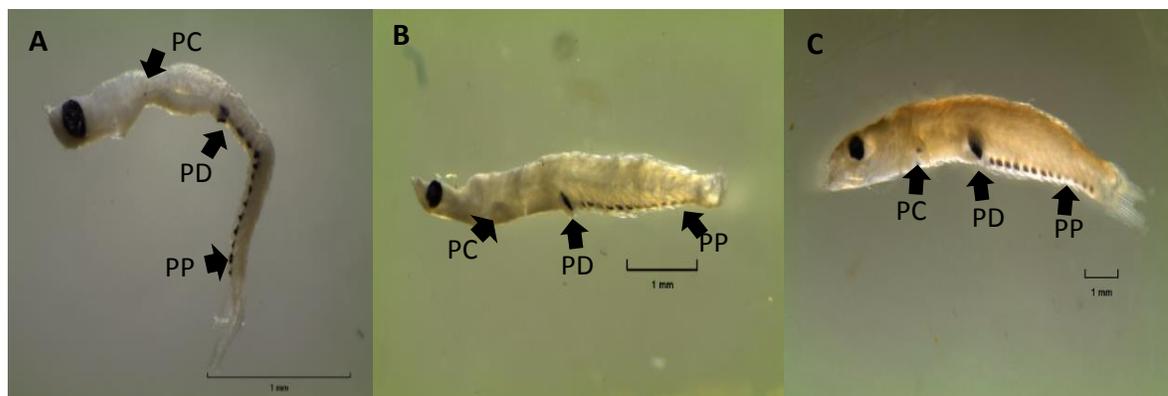
**Figura 9.** Fotografías de especímenes de *S. atomarium*: A) Larva en estadio de preflexión LE = 2.57 mm; B) Larva en estadio de flexión LE= 4.29 mm; C) Larva en estadio de post-flexión LE = 7.94 mm; D) Larva estadio de post-flexión LE = 5.14. Pigmento cardíaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).



**Figura 10.** Fotografías de especímenes de *S. aurofrenatum*: A) Larva en estado de preflexión LE = 2.86 mm; B) Larva en estado de post-flexión LE= 5.6 mm. Pigmento cardíaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).



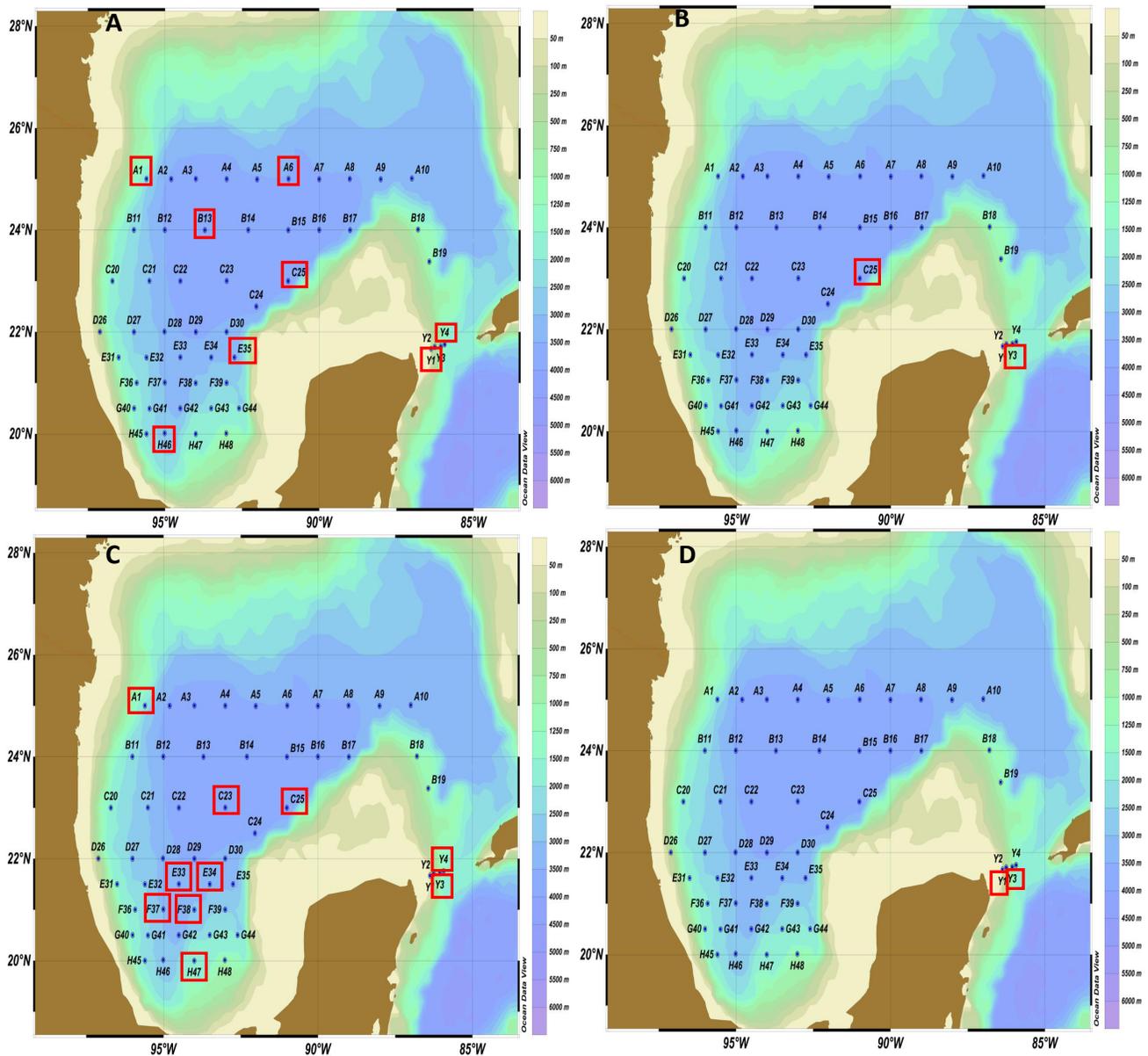
**Figura 11.** Fotografías de especímenes de *S. chrysopterum*: A) Larva en estado de preflexión LE = 3.53 mm; B) Larva en estado de post-flexión LE= 3.36 mm. Pigmento cardíaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).



**Figura 12.** Fotografías de especímenes de *S. radians*: A) Larva en estado de preflexión LE = 2.39 mm; B) Larva en estado de flexión LE= 4.29 mm; C) Larva en estado de post-flexión LE= 8.41 mm. Pigmento cardíaco (PC), pigmento del intestino y pigmento post-anal (PA).

### 3.2.2- Registro de especies de *Sparisoma* en el área de muestreo

Las larvas identificadas molecularmente se distribuyeron en 15 estaciones. En el caso de *S. atomarium* se registró la presencia de al menos un espécimen en las estaciones A1, A8, C25, E35, F37, H46, Y2 y Y4, *S. aurofrenatum* fue registrada en las estaciones C25 y Y3, *S. radians* fue registrada en las estaciones A1, C23, C25, E33, E34, F37, F38, h47 y por último, *S. chrysopterum* fue registrada en las estaciones Y1 y Y3 (Fig. 13 ).



**Figura 13.** Mapas de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes de las cuatro especies de *Sparisoma*. con un cuadro de color anaranjado. A) Registros de *S. atomarium*. B) Registros de *S. aurofrenatum*. C) Registros de *S. chrysopterum*. D) Registros de *S. radians*. Modificado del mapa elaborado por la Dra. Paola G. Batta Lona.

### 3.2.3.- Identificación molecular del género *Bothus*

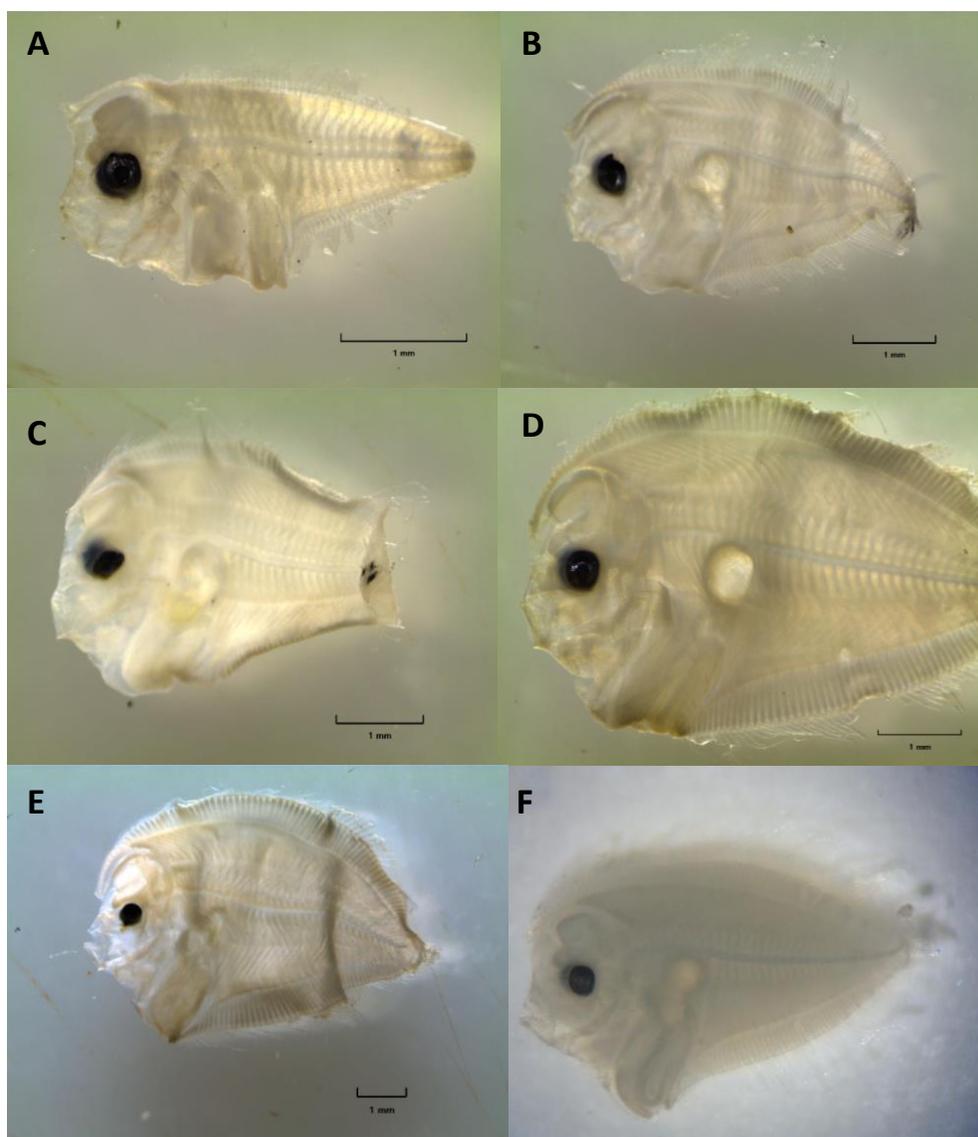
Morfológicamente se identificaron 34 larvas en *B. ocellatus*, sin embargo se realizó la identificación molecular de 17 larvas. La identificación se realizó a partir del análisis de las secuencias del marcador molecular COI (17 secuencias). Sólo se corroboró la identificación morfológica de un espécimen de *B. ocellatus*, los 16 especímenes restantes se identificaron molecularmente como *B. robinsi*. La corroboración de la identificación molecular se realizó con el análisis de ocho secuencias del marcador molecular 16S, todas las identificaciones realizadas con el 16S coincidieron con las identificaciones realizadas con el COI.

Los alineamientos que se realizaron con las secuencias generadas con los marcadores moleculares COI y 16 con respecto a las secuencias encontradas en el GenBank, indicaron valores de porcentaje de identidad del 99% en todos los casos y valores de e- value de 0. Los porcentajes de cobertura de las secuencias de 16S y COI indicaron valores de 100% y 96% respectivamente. Con los valores calculados se confirma la identificación molecular de 16 especímenes de *B. robinsi* y uno de *B. ocellatus* (Anexo J y K).

Se registró la presencia de al menos una larva de *B. robinsi* en cada uno de los tres estadios larvales (preflexión, flexión y post-flexión), para *B. ocellatus* (Fig. 14) sólo se registró la presencia de una larva en estadio de flexión (Tabla 7).

**Tabla 7.** Número de especímenes identificados molecularmente de *Bothus* por especie y estadio larval.

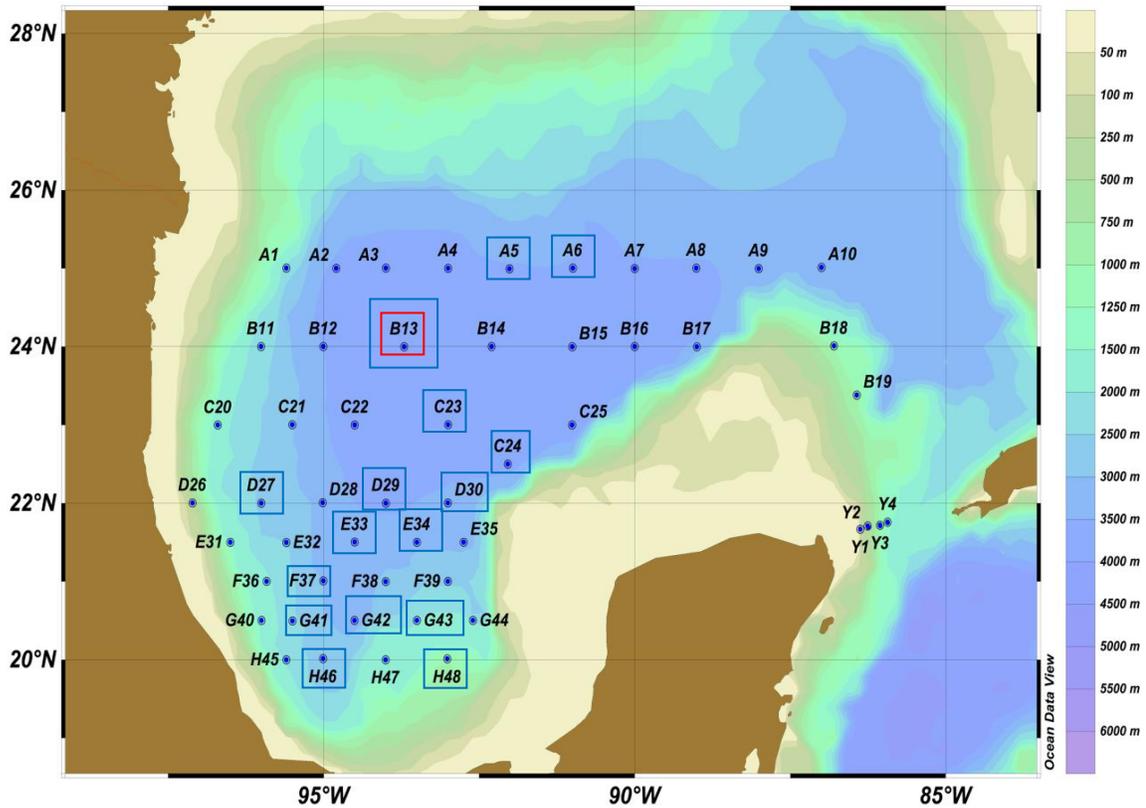
Espece	Preflexión	Flexión	Post-flexión	Total
<i>B. robinsi</i>	7	1	8	16
<i>B. ocellatus</i>	0	0	1	1



**Figura 14.** Fotografías de especímenes de *Bothus*: A) *B. robinsi* en preflexión LE = 3.28 mm; B) *B. robinsi* en preflexión LE = 4.35 mm; C) *B. robinsi* en estadio de flexión LE = 4.12 mm; D) *B. robinsi* en estadio de post-flexión LE = 5.98 mm; E) *B. robinsi* en estadio de post-flexión LE = 6.87 mm; F) *B. ocellatus* en estadio de post-flexión LE = 4.45 mm.

### 3.2.4.- Registro de especies de *Bothus* en el área de muestreo

Los 17 especímenes identificados molecularmente se distribuyeron en 13 estaciones de la zona de muestreo. La larva de *B. ocellatus* se registró en la estación B13. Las larvas de *B. robinsi* se encontró al menos una larvas en las etaciones A5, A6, B13, C24, D27, D30, E33, E34, G40, G42, H46 y H47.



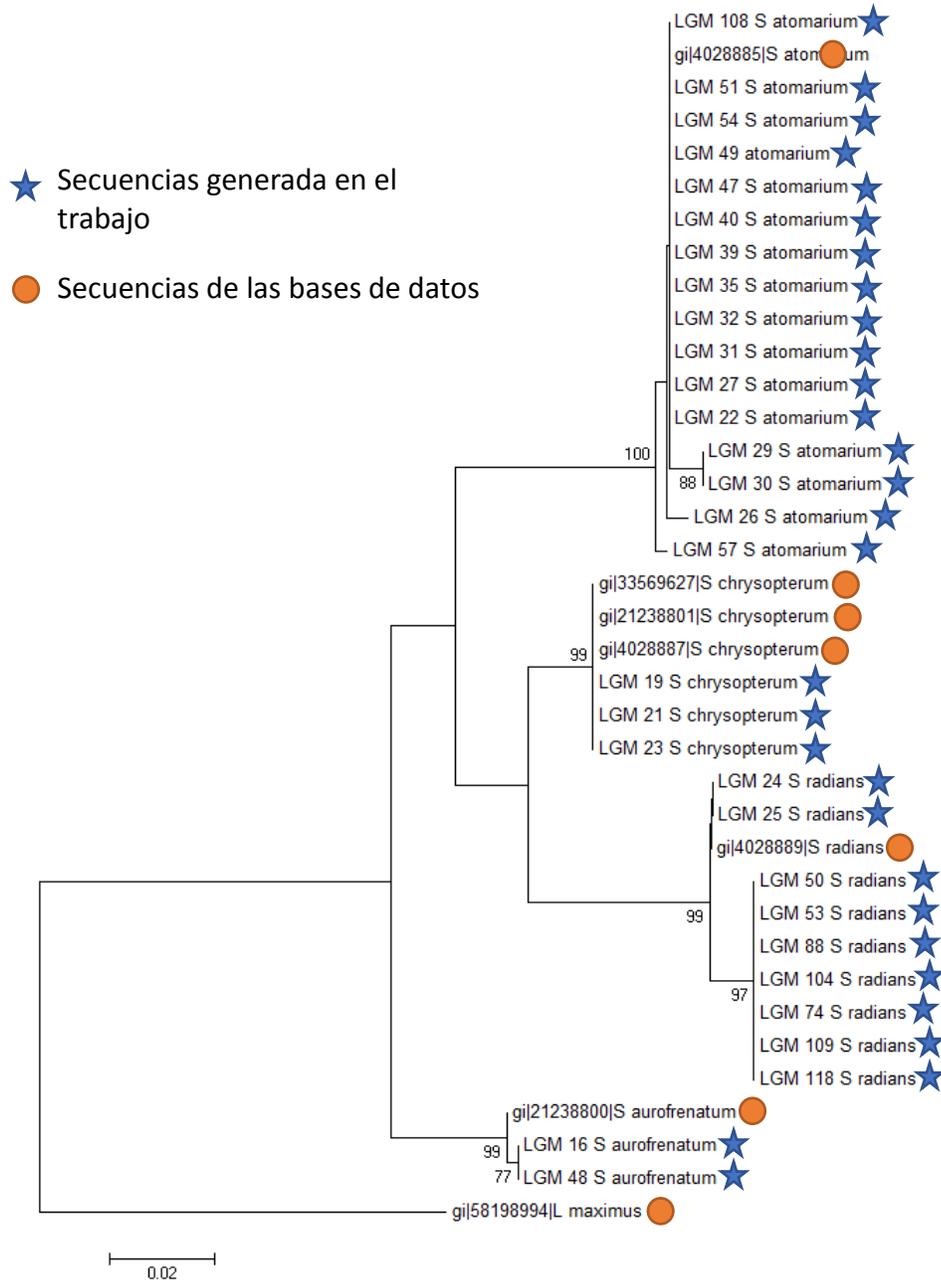
**Figura 15.** Mapa de las estaciones del muestreo del XIXIMI-04 donde se marcan las estaciones en las cuales se registró la presencia de especímenes *B. ocellatus*. con un cuadro de color azul y las estaciones donde se registro a *B. ocellatus* se marcó con un cuadro rojo. Modificado del mapa elaborado por Paola G. Batta Lona.

### 3.3. Relaciones filogenéticas

#### 3.3.1. Árboles filogenéticos y cuadros de distancia genética de especímenes de *Sparisoma*

Se realizó un árbol filogenético con secuencias del marcador molecular 16S de los especímenes del género *Sparisoma* que fueron identificados molecularmente. El árbol está compuesto por las 30 secuencias generadas del género *Sparisoma*, también se incluyeron secuencias del GenBank (Anexo L): *S. atomarium* (una secuencia), *S. aurofrenatum* (una secuencia), *S. chrysopterum* (tres secuencias), *S. radians* (una secuencia) y *Lachnolaimus maximus* (seleccionado como grupo externo, se usó una secuencia). La distancia genética fue calculada con el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros, la topología del árbol se generó a partir del método de máximo likelihood y la robustez de las ramas se calculó a través del método estadístico de Bootstrap.

En el árbol se formaron cuatro clados, cada uno de los clados corresponde a una especie. La rama de *S. atomarium* indicaron un porcentaje de robustez del 100%, las ramas de *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians* indicaron porcentajes del 99%. Esto da mayor robustez a las identificaciones moleculares (Fig. 19).



**Figura 16.** Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular 16S. El análisis incluye 37 secuencias de los géneros *Sparisoma* y *Lachnolaimus* (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank.

Para complementar al árbol filogenético se realizó una tabla de distancia genética. Se observó que la especie más alejada genéticamente del género *Sparisoma* es *S. radians* al calcularse valores mayores de 0.1 con respecto a *S. aurofrenatum* y *S. atomarium*. *S. radians* es más cercano genéticamente con respecto a *S. chrysopterum* con un valor de 0.064. En lo que respecta a las comparaciones entre *S. aurofrenatum*, *S. atomarium* y *S. chrysopterum* indicaron valores menores a 0.1 (Tabla 8).

**Tabla 8.** Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular 16S entre especies del género *Sparisoma* y *Lachnolaimus* (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.

Especies	1	2	3	4
1. <i>S. aurofrenatum</i>				
2. <i>S. atomarium</i>	0.096			
3. <i>S. chrysopterum</i>	0.060	0.089		
4. <i>S. radians</i>	0.126	0.112	0.064	
5. <i>L. maximus</i> .	0.283	0.339	0.279	0.307

Al comparar las secuencias (518 pb) se observó que existe una mayor cantidad de polimorfismos inter-específicamente que intra-específicamente. La especie que presentó una mayor cantidad de polimorfismos con respecto a las otras especies del género *Sparisoma* fue *S. radians* con valores de 33 y 39 polimorfismos al compararse con *S. atomarium* y *S. aurofrenatum* respectivamente (Tabla 9)

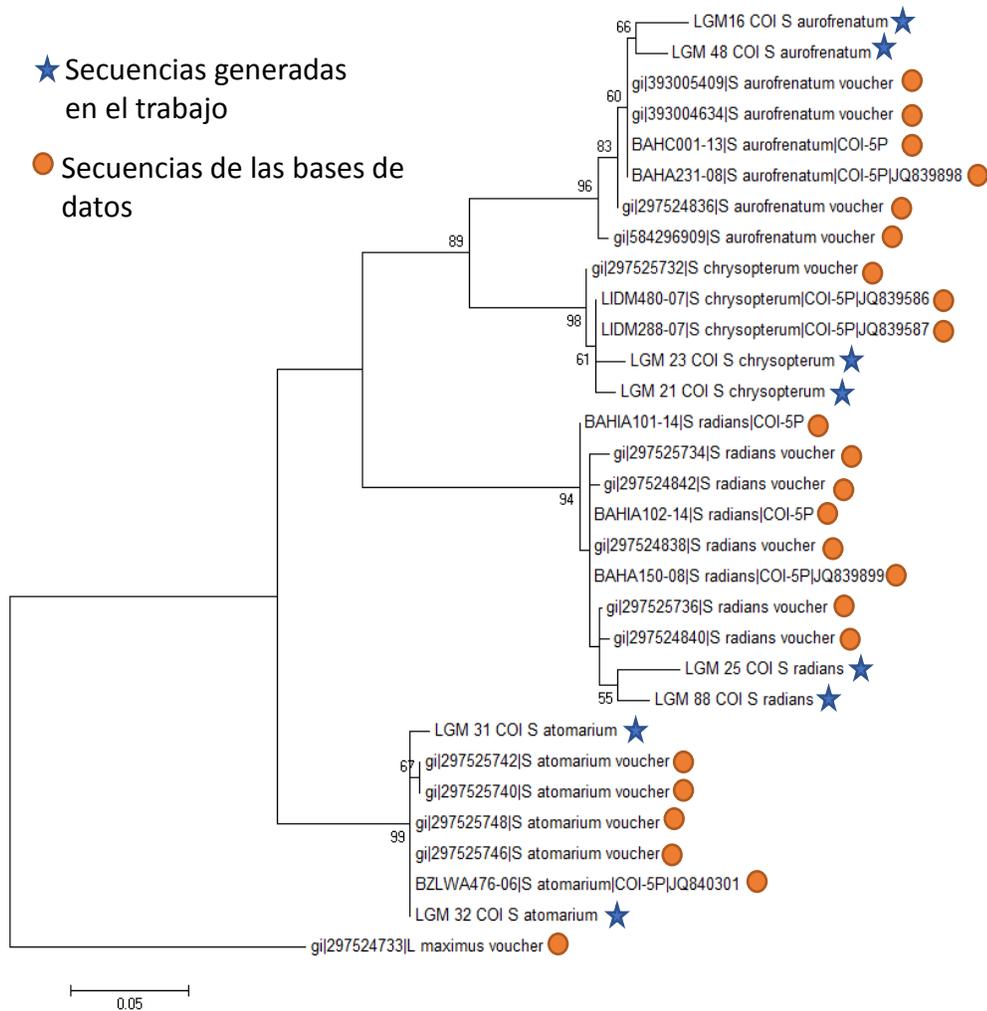
**Tabla 9.** Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular 16S entre especies del género *Sparisoma* y *Lachnolaimus* (grupo externo).

Especies	1	2	3	4	5
1. <i>S. aurofrenatum</i>	1				
2. <i>S. atomarium</i>	29	2			
3. <i>S. chrysopterum</i>	23	28	0		
4. <i>S. radians</i>	39	33	25	0	
5. <i>L. maximus</i>	62	68	62	65	0

Se realizó un árbol filogenético del marcador molecular COI. El árbol está compuesto por las ocho secuencias generadas del género *Sparisoma*, también se incluyeron secuencias del GenBank: *S. atomarium*

(cinco secuencias), *S. aurofrenatum* (seis secuencias), *S. chrysopterum* (tres secuencias), *S. radians* (ocho secuencias) y *Lachnolaimus maximus* (seleccionado como grupo externo, se usó una secuencia). La distancia genética fue calculada con el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros, la topología del árbol se generó a partir del método de máximo likelihood y la robustez de las ramas se calculó a través del método estadístico de Bootstrap.

En el árbol se formaron cuatro clados, cada uno de los clados corresponde a una especie. La rama de *S. atomarium* tiene un porcentaje de robustez del 99%, la rama de *S. aurofrenatum* indicó un porcentaje de 96%, la rama de *S. chrysopterum* indicó un porcentaje con 98% y la rama *S. radians* indicó un porcentaje con 94% (Fig. 20).



**Figura 17.** Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular COI. El análisis incluye 31 secuencias de los géneros *Sparisoma* y *Lachnolaimus* (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank y BOLD System es el COI-5P.

De acuerdo con las distancias genéticas se observó que *S. radians* es la especie que se aleja más de las otra especie al presentar valores mayores de 228.9 Las especies que están más cercanas genéticamente son *S. aurofrenatum* y *S. chrysopterum* (Tabla 10)

**Tabla 10.** Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular COI entre especies del género *Sparisoma* y *Lachnolaimus* (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.

Especies	1	2	3	4
1. <i>S. aurofrenatum</i>				
2. <i>S. atomarium</i>	0.205			
3. <i>S. chrysopterum</i>	0.156	0.203		
4. <i>S. radians</i>	0.312	0.228	0.281	
5. <i>L. maximus</i>	0.455	0.335	0.385	0.299

Al comparar las secuencias (253 pb) se observó que existe una mayor cantidad de polimorfismos inter-específicamente que intra-específicamente. La especie que presentó una mayor cantidad de polimorfismos con respecto a las otras especies del género *Sparisoma* fue *S. radians* con valores de 34, 36 y 37 polimorfismos al compararse con *S. atomarium*, *S. chrysopterum*, y *S. aurofrenatum* respectivamente (Tabla 11)

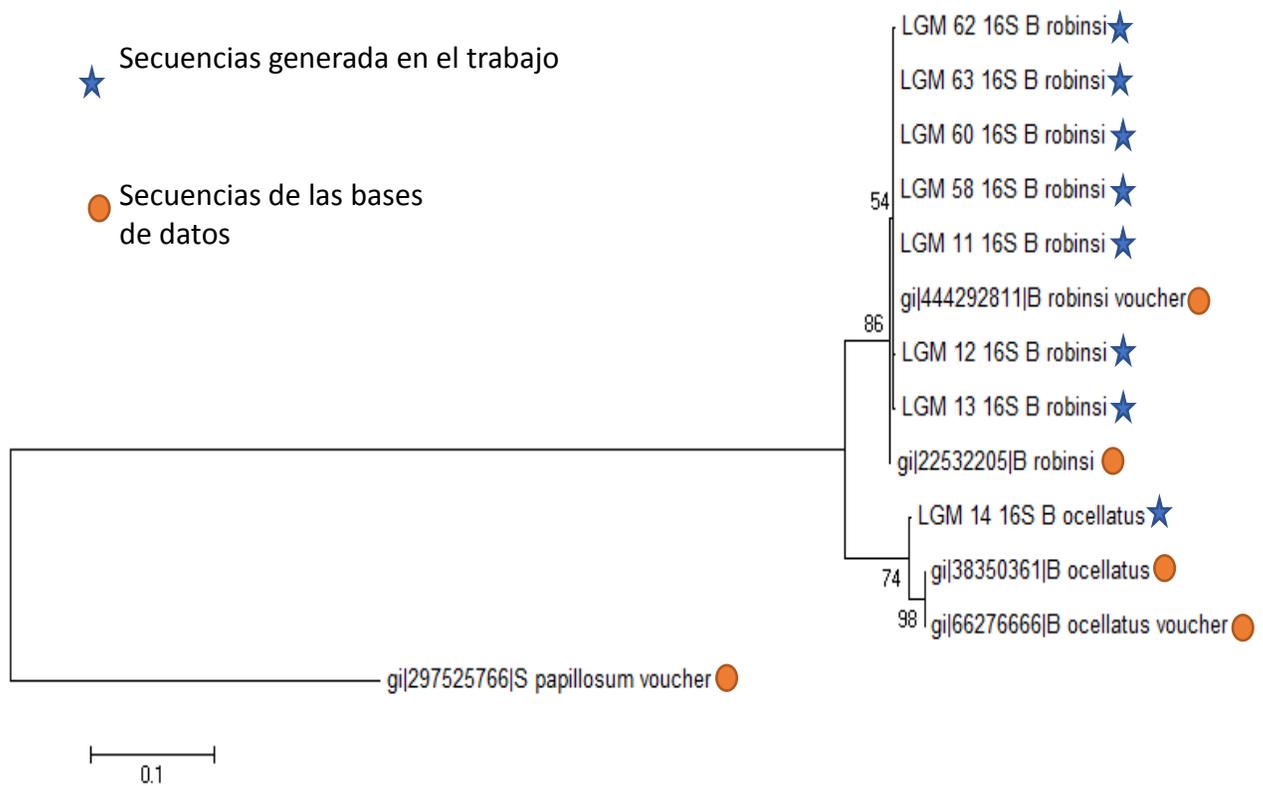
**Tabla 11.** Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular COI entre especies del género *Sparisoma* y *Lachnolaimus* (grupo externo).

Especies	1	2	3	4	5
1. <i>S. aurofrenatum</i>	9				
2. <i>S. atomarium</i>	30	2			
3. <i>S. chrysopterum</i>	22	33	5		
4. <i>S. radians</i>	37	34	36	11	
5. <i>L. maximus</i>	54	48	51	42	0

### 3.3.2. Árboles filogenéticos y cuadros de distancia genética de especímenes de *Bothus*.

Se realizó un árbol filogenético con secuencias del marcador molecular 16S. El árbol está compuesto por las 8 secuencias generadas del género *Bothus*, también se incluyeron secuencias del GenBank: *B. ocellatus* (dos secuencias), *B. robinsi* (dos secuencias) y *Syacium papillosum* (seleccionado como grupo externo, se usó una secuencia). La distancia genética fue calculada con el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros, la topología del árbol se generó a partir del método de máximo likelihood y la robustez de las ramas se calculó a través del método estadístico de Bootstrap.

En el árbol se formaron dos clados, cada uno de los clados corresponde a una especie. La rama de *B. ocellatus* indicó un porcentaje de robustez del 74%, la rama de *B.robinsi* indicó un porcentaje de 86%. Con los cuál da mayor robustez a las identificaciones(Fig. 18).



**Figura 18.** Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular 16S. El análisis incluye 13 secuencias de los géneros *Bothus* y *Syacium* (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank.

La distancia genética que se calculó de *B. ocellatus* y *B. robinsi* arrojó un valor de 0.150 entre ellos (Tabla 12).

**Tabla 12.** Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular 16S entre especies del género *Bothus* y *Syacium* (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.

Especies	1	2
1.- <i>B. ocellatus</i>		
2.- <i>B. robinsi</i>	0.150	
3.- <i>S. papillosum</i>	0.495	0.494

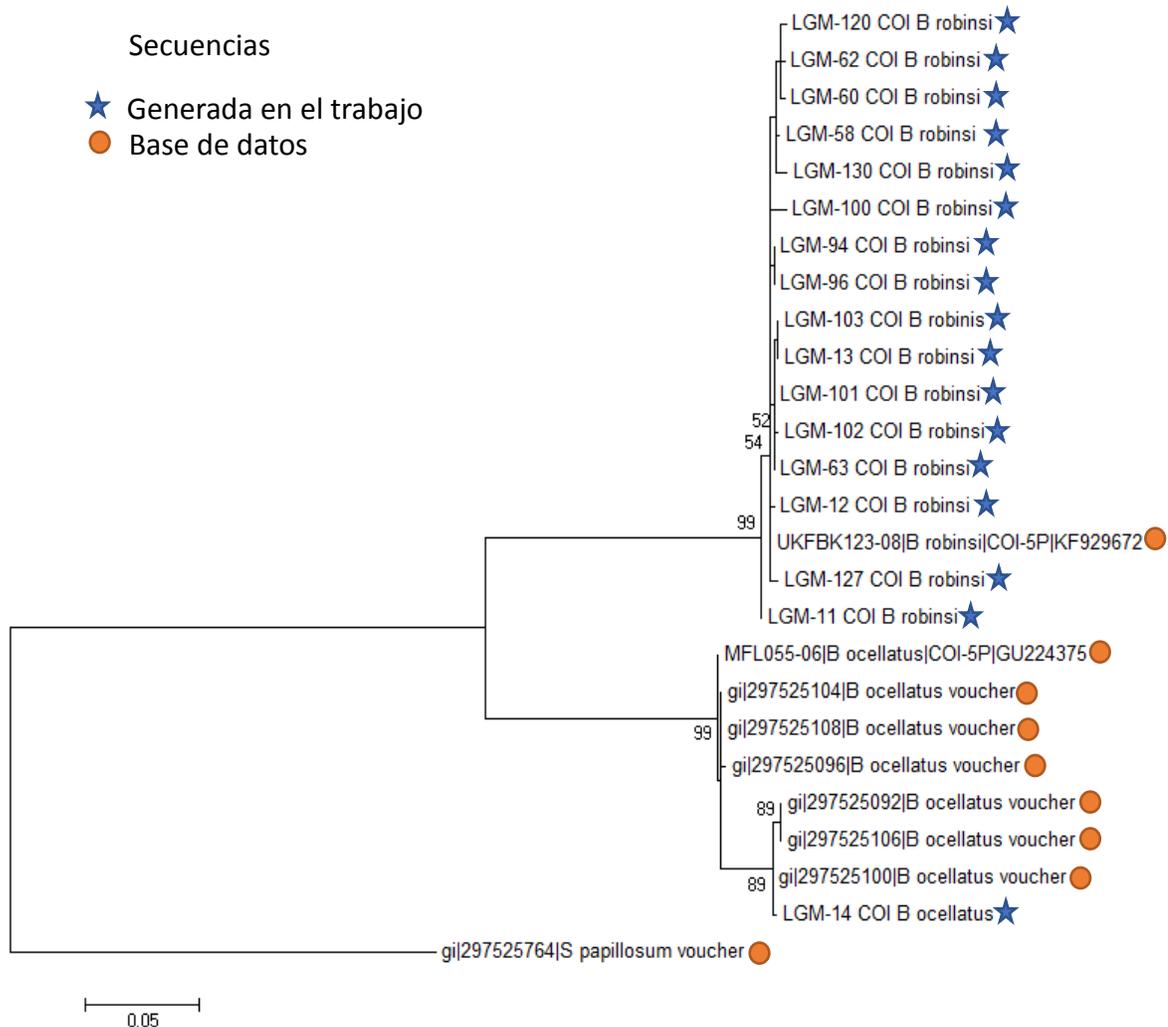
La cantidad de polimorfismos entre las secuencias (536 pb) de *B. ocellatus* y *B. robinsi* es 45 (Tabla 13).

**Tabla 13.** Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular 16S entre especies del género *Bothus* y *Syacium* (grupo externo).

Especies	1	2	3
1.- <i>B. ocellatus</i>	8		
2.- <i>B. robinsi</i>	45	1	
3.- <i>S. papillosum</i>	84	88	11

Se realizó un árbol filogenético del marcador molecular COI. El árbol está compuesto por las 17 secuencias generadas del género *Bothus*, también se incluyeron secuencias del GenBank: *B. ocellatus* (siete secuencias), *B. robinsi* (una secuencia) y *S. papillosum* (seleccionado como grupo externo, una secuencia). La distancia genética fue calculada con el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros, la topología del árbol se generó a partir del método de máximo likelihood y la robustez de las ramas se calculó a través del método estadístico de Bootstrap.

En el árbol se formaron dos clados, cada uno de los clados corresponde a una especie. Las ramas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* indicaron un porcentaje de robustez del 99% (Fig. 19). Las secuencias de las especies identificadas molecularmente coincidieron con el clado de la especie asignada.



**Figura 19.** Árbol filogenético de las secuencias del marcador molecular COI. El análisis incluye 31 secuencias de los géneros *Bothus* y *Syacium* (grupo externo). El método de sustitución utilizado fue Kimura 2 parámetros, la topología se generó a partir del método de máximo likelihood y el soporte de las ramas se calculó por medio del método de Bootstrap (3000 iteraciones). Todos los parámetros utilizados se calcularon con el programa Mega 7. Las secuencias que no se generaron en el trabajo se tomaron del GenBank. El gi es el número de identificación de la secuencia del GenBank y BOLD System es el COI-5P.

La distancia genética se calculó y se observó que las secuencias de *B. ocellatus* y *B. robinsi* presentaron un valor de 0.393. (Tabla 14).

**Tabla 14.** Valores de distancia genética de las secuencias del marcador molecular COI entre especies del género *Bothus* y *Syacium* (grupo externo). La distancia genética se calculó utilizando el modelo de sustitución de kimura 2 parámetros.

<b>Especies</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
1. <i>B. ocellatus</i>		
2. <i>B. robinsi</i>	0.393	
3. <i>S. papillosum</i>	1.230	1.167

En cuestión de las secuencias (578 pb) del marcador molecular COI polimorfismos se observó que entre *B. ocellatus* y *B. robinsi* presentaron 94 polimorfismos entre sus secuencias. (Tabla 15).

**Tabla 15.** Cantidad de polimorfismos presentados entre las secuencias del marcados molecular COI entre especies del género *Bothus* y *Syacium* (grupo externo).

<b>Especies</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1. <i>B. ocellatus</i>	5		
2. <i>B. robinsi</i>	94	5	
3. <i>S. papillosum</i>	152	150	1

### 3.3.3. Árbol filogenético y asignación taxonómica de secuencias de la región V9 del 18S ribosomal.

Se generó una árbol filogenético con 39 secuencias de la región V9 del 18S ribosomal generadas en este trabajo (las secuencias son de especímenes de diferentes ordenes de peces), dos secuencias del GenBank, además de una secuencias del orden de los Carcharhiniformes el cual se obtuvo de las secuencias Genbank y que sirvió como grupo externo. La distancia genética fue calculada con el modelo de sustitución de Jukes-Cantor, la topología del árbol se generó a partir del método de maximum likelihood y la robustez de las ramas se calculó a través del método estadístico de Bootstrap (Fig. 20).

Se formaron clados con secuencias de diferentes ordenes. Hubo casos en los que si formaron los clados esperados como son todas las secuencias de los myctophiformes los cuales se ordenaron en una



Las secuencias de la región V9 del 18S ribosomal se compararon con las secuencias de datos de Silva, esta comparación se realizó para darle una asignación taxómica a las secuencias generadas en este trabajo. Se trabajaron con 34 secuencias de tres órdenes: Stomiiformes (secuencias secuencias), Pleuronectiformes (13 secuencias) y Perciformes (12 secuencias). Todas las secuencias generadas de la región V9 del 18S ribosomal provienen de especímenes previamente identificados a partir del análisis de las secuencias de los marcadores moleculares COI o 16S. Las 34 secuencias de la región V9 del 18S ribosomal se asignaron al reino Animalia con un porcentaje de robustez mayor de 97%. De las 34 secuencias 32 fueron asignadas al filo Chordata (el porcentaje mínimo de robustez fue de 44% y la mayoría de las secuencias presentaron un porcentaje mayor al 90%), una secuencia se asignó a Cnidaria (robustez de 15.1%) y una a Brachiopoda (robustez del 10%). En las asignación en nivel de clase la mayoría de las secuencias se asignaron en la clase Actinopterygii, una a la clase Craniata, una a la clase Hydrozoa y una a la clase Elasmobranchii (Tabla 16).

**Tabla 16.** Tabla de la asignación de nivel taxonómico (Reino, Filo, Clase) de 34 secuencias de la región v9 del 18S ribosomal (especímenes previamente identificados) tomando como referencia la base de datos de Silva. Además de mostrar el valor de bootstrap asignado. Cuadro modificado del elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.

Orden identificado	Reino asignado	% bootstrap	Filo asignado	% bootstrap	Clase asignado	% bootstrap
Stomiiformes_m1	Animalia	100	Chordata	85.4	Actinopterygii	68
Stomiiformes_m2	Animalia	99.8	Chordata	85	Actinopterygii	67.4
Stomiiformes_m3	Animalia	97.1	Chordata	86.7	Actinopterygii	64.4
Stomiiformes_m4	Animalia	99.9	Chordata	84.7	Actinopterygii	68.6
Stomiiformes_m5	Animalia	99.8	Chordata	85.5	Actinopterygii	67.9
Stomiiformes_m6	Animalia	99.9	Chordata	86.7	Actinopterygii	69.9
Stomiiformes_c31	Animalia	100	Chordata	98.3	Elasmobranchii	49.7
Stomiiformes_c32	Animalia	99.9	Chordata	86.4	Actinopterygii	68.9
Stomiiformes_c35	Animalia	100	Chordata	98.2	Actinopterygii	97.9
Pleuronectiformes_m7	Animalia	95.3	Chordata	56.8	Actinopterygii	44.9
Pleuronectiformes_m8	Animalia	95.4	Chordata	69.7	Actinopterygii	51.9
Pleuronectiformes_m9	Animalia	80.5	Cnidaria	15.1	Hydrozoa	9.8
Pleuronectiformes_m10	Animalia	91.2	Chordata	44	Actinopterygii	36.8
Pleuronectiformes_m11	Animalia	100	Chordata	98	Actinopterygii	97.2
Pleuronectiformes_m12	Animalia	100	Chordata	98.9	Actinopterygii	98.5
Pleuronectiformes_m13	Animalia	100	Chordata	98.7	Actinopterygii	98.3
Pleuronectiformes_m14	Animalia	100	Chordata	98.4	Actinopterygii	97.8
Pleuronectiformes_c70	Animalia	98.8	Chordata	87.4	Actinopterygii	74.8
Pleuronectiformes_c87	Animalia	100	Chordata	97.3	Actinopterygii	97.3
Pleuronectiformes_c88	Animalia	100	Chordata	98.3	Actinopterygii	97.9
Pleuronectiformes_c89	Animalia	100	Chordata	98	Actinopterygii	97.7
Pleuronectiformes_c112	Animalia	100	Chordata	98.6	Actinopterygii	61.4
Perciformes_m16	Animalia	100	Chordata	95.6	Actinopterygii	92.1
Perciformes_m17	Animalia	100	Chordata	94.5	Actinopterygii	90.7
Perciformes_m18	Animalia	100	Chordata	94.4	Actinopterygii	90.9
Perciformes_m19	Animalia	100	Chordata	96	Actinopterygii	92.4

Continuación. Tabla 16

Orden identificado	Reino asignado	% bootstrap	Filo asignado	% bootstrap	Clase asignado	% bootstrap
Perciformes_m20	Animalia	100	Chordata	96.1	Actinopterygii	91.8
Perciformes_21	Animalia	100	Chordata	93.4	Actinopterygii	89.3
Perciformes_m21	Animalia	100	Chordata	95.9	Actinopterygii	92.8
Perciformes_m30	Animalia	100	Chordata	95.1	Actinopterygii	91.9
Perciformes_c1	Animalia	100	Chordata	98.1	Actinopterygii	97.7
Perciformes_c3	Animalia	100	Brachiopoda	10	Craniata	10
Perciformes_c53	Animalia	100	Chordata	100	Actinopterygii	100
Perciformes_c54	Animalia	100	Chordata	100	Actinopterygii	100

En las asignaciones en el nivel de orden, hubo casos donde las secuencias previamente identificadas molecularmente (con el marcador molecular 16S o COI ) como pleuronectiformes fueron asignados al orden de los perciformes, en algunos casos las secuencias que fueron asignados previamente en perciformes (con el marcados molecular 16S o COI) en esta nueva asignación con la región V9 del 18S no se logró asignar a ningún nivel taxonómico (NA). A partir de orden, la mayoría de las asginaciones taxonómicas se les calculó un porcentaje de robustez menor al 80%. En las asignaciones en el nivel de familia el porcentaje de robustez es menor al 50% y en ninguno de los casos las asginaciones corresponden a las identificaciones previas (Tabla 17).

**Tabla 17.** Tabla de la asignación de nivel taxonómico (Orden, Familia) de las secuencias de la región v9 del 18S ribosomal (especímenes previamente identificados) tomando como referencia la base de datos de Silva y Tara Oceans. Además de mostrar el valor de bootstrap asignado. N/A=No asginado. Cuadro modificado del elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.

Orden identificado	Orden asignado	% bootstrap	Familia asignada	% bootstrap
Stomiiformes_m1	Perciformes	32.6	Percichthyidae	12
Stomiiformes_m2	Perciformes	29.6	Percichthyidae	11
Stomiiformes_m3	Perciformes	26.9	Percichthyidae	10.7
Stomiiformes_m4	Perciformes	30.8	Percichthyidae	12.4
Stomiiformes_m5	Perciformes	30.4	Percichthyidae	11.4
Stomiiformes_m6	Perciformes	29.8	Percichthyidae	11.9
Stomiiformes_c31	Myliobatiformes	49.1	Potamotrygonidae	49.1
Stomiiformes_c32	Perciformes	32.4	Percichthyidae	13.3
Stomiiformes_c35	Pleuronectiformes	54.4	Pleuronectidae	54.4
Pleuronectiformes_m7	Perciformes	36.8	Percichthyidae	15
Pleuronectiformes_m8	Perciformes	39.6	Percichthyidae	25.3
Pleuronectiformes_m9	Anthoathecata	8.6	Hydractiniidae	6.4
Pleuronectiformes_m10	Perciformes	23.9	Percichthyidae	8.5
Pleuronectiformes_m11	Perciformes	80.5	Percichthyidae	40.8
Pleuronectiformes_m12	Perciformes	83.8	Percichthyidae	42.1

Continuación. Tabla 17

Orden identificado	Orden asignado	% bootstrap	Familia asignada	% bootstrap
Pleuronectiformes_m13	Perciformes	82	Percichthyidae	40.5
Pleuronectiformes_m14	Perciformes	82	Percichthyidae	43
Pleuronectiformes_c70	Perciformes	46.2	Percichthyidae	23.5
Pleuronectiformes_c87	Perciformes	80.7	Percichthyidae	38.7
Pleuronectiformes_c88	Perciformes	82.4	Percichthyidae	42.2
Pleuronectiformes_c89	Perciformes	82.2	Percichthyidae	42.3
Pleuronectiformes_c112	Pleuronectiformes	39.9	Pleuronectidae	16.1
Perciformes_m16	Perciformes	69.9	Percichthyidae	38
Perciformes_m17	Perciformes	71.6	Percichthyidae	36.7
Perciformes_m18	Perciformes	69.8	Percichthyidae	38.5
Perciformes_m19	Perciformes	74.7	Percichthyidae	38.8
Perciformes_m20	Perciformes	69.6	Percichthyidae	38.5
Perciformes_m21	Perciformes	70.7	Percichthyidae	35.9
Perciformes_m21	Perciformes	71.9	Percichthyidae	37.5
Perciformes_m30	Perciformes	69.9	Percichthyidae	37.3
Perciformes_c1	Perciformes	82.7	Percichthyidae	39.5
Perciformes_c3	NA	10	NA	10
Perciformes_c53	Perciformes	93.8	Scombridae	93.1
Perciformes_c54	Perciformes	95.4	Scombridae	94.9

A nivel de género a todas las asignaciones se les calculó un porcentaje de robustez menor al 50% y los géneros que fueron asignados son de peces de agua dulce. Por último. En el nivel de especie a sólo cinco secuencias se les asignó el nombre de un especie, pero ninguna coincidió con las identificación previamente realizada con los marcadores moleculares COI o 16S (Tabla 18).

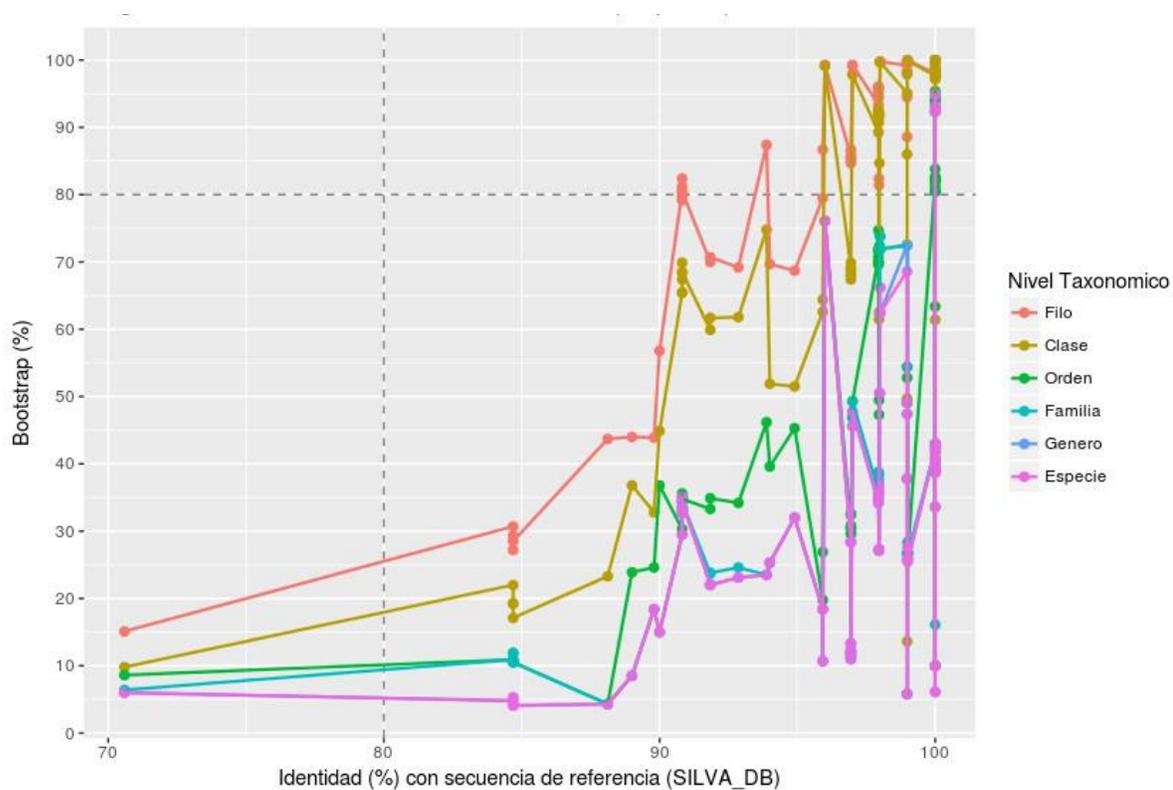
**Tabla 18.** Tabla de la asignación de nivel taxonómico (Género, Especie) de las secuencias de la región v9 del 18S ribosomal (especímenes previamente identificados) tomando como referencia la base de datos de Silva. Además de mostrar el valor de bootstrap asignado. Cuadro modificado del elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.

Orden identificado	Género asignado	% bootstrap	Especie asignada	% bootstrap
Stomiiformes_m1	Siniperca	12	NA	12
Stomiiformes_m2	Siniperca	11	NA	11
Stomiiformes_m3	Siniperca	10.7	NA	10.7
Stomiiformes_m4	Siniperca	12.4	NA	12.4
Stomiiformes_m5	Siniperca	11.4	NA	11.4
Stomiiformes_m6	Siniperca	11.9	NA	11.9
Stomiiformes_c31	Potamotrygon	49.1	NA	49.1
Stomiiformes_c32	Siniperca	13.3	NA	13.3
Stomiiformes_c35	Kareius	47.4	<i>Kareius_bicoloratus</i>	47.4

Continuación. Tabla 18

Orden identificado	Género asignado	% bootstrap	Especie asignada	% bootstrap
Pleuronectiformes_m7	Siniperca	15	NA	15
Pleuronectiformes_m8	Siniperca	25.3	NA	25.3
Pleuronectiformes_m9	Podocoryna	6	<i>Podocoryna_exigua</i>	6
Pleuronectiformes_m10	Siniperca	8.5	NA	8.5
Pleuronectiformes_m11	Siniperca	40.8	NA	40.8
Pleuronectiformes_m12	Siniperca	42.1	NA	42.1
Pleuronectiformes_m13	Siniperca	40.5	NA	40.5
Pleuronectiformes_m14	Siniperca	43	NA	43
Pleuronectiformes_c70	Siniperca	23.5	NA	23.5
Pleuronectiformes_c87	Siniperca	38.7	NA	38.7
Pleuronectiformes_c88	Siniperca	42.2	NA	42.2
Pleuronectiformes_c89	Siniperca	42.3	NA	42.3
Pleuronectiformes_c112	Cleisthenes	6.1	<i>Cleisthenes_herzensteini</i>	6.1
Perciformes_m16	Siniperca	35.9	NA	35.9
Perciformes_m17	Siniperca	35.2	NA	35.2
Perciformes_m18	Siniperca	36.7	NA	36.7
Perciformes_m19	Siniperca	37	NA	37
Perciformes_m20	Siniperca	36.1	NA	36.1
Perciformes_21	Siniperca	34.2	NA	34.2
Perciformes_m21	Siniperca	35.7	NA	35.7
Perciformes_m30	Siniperca	34.9	NA	34.9
Perciformes_c1	Siniperca	39.5	NA	39.5
Perciformes_c3	NA	10	NA	10
Perciformes_c53	Auxis	93.1	<i>Auxis_rochei</i>	93.1
Perciformes_c54	Auxis	94.9	<i>Auxis_rochei</i>	94.9

A partir de los porcentajes de robustez obtenidos en la asignación taxonómica se definió hasta cual nivel taxonómico el marcador molecular de la región V9 del 18S ribosomal era capaz de asignar con certidumbre. Se determinó que este marcador molecular era capaz de asignar con certidumbre en los niveles taxonómicos de filo y clase. Se calculó en estos dos casos que los porcentajes de identidad y robustez eran superiores al 90% y 80% respectivamente en la mayoría de las asignaciones taxonómica. En el caso de las asignaciones en niveles de orden, familia, género y especie los porcentajes de robustez eran menores al 80% reduciendo la certidumbre, por lo que estas asignaciones no son confiables (Fig. 21).



**Figura 21.** Gráfica del porcentaje de identidad y el porcentaje de la asignación taxonómica de cada una de las 76 secuencias generadas para la región v9 del 18S ribosomal con respecto a las secuencias en la base de datos Silva (VERSION )y Tara Oceans (Version). Cada punto representa una secuencia con un determinado valor de identidad y de confiabilidad (Bootstrap), el color de cada punto representa su asignación dependiendo el nivel taxonómico. Gráfico elaborado por el Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Identificación de especímenes de *Sparisoma*

Una de las problemáticas en la identificación morfológica de larvas del género *Sparisoma* fue la escasa información registrada sobre las características morfológicas en guías de identificación de larvas de peces del Atlántico, incluyendo las de Fahay (1983), Richards (2006) y Fahay (2007). La guía de Fahay (1983) no posee descripciones de *Sparisoma*, y en la publicación de Fahay (2007) se encuentra la descripción de sólo una especie (*S. rubripinne*). La guía con más información es la de Richards (2006), que cuenta con el registro de seis especies de *Sparisoma* (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum*, *S. radians*, *S. rubripinne* y *S. viride*) y con descripciones detalladas de las características morfológicas de tres especies de este género (*S. atomarium*, *S. radians* y *S. rubripinne*).

A partir de la guía de Richards (2006) se observó que la información sobre la merística de las especies (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum*, *S. radians*, *S. rubripinne* y *S. viride*) son similares, la característica merística que diferencia estas especies es el número de “gillrakers”, ya que en *S. atomarium* se deberían observar entre 10-13, *S. aurofrenatum* entre 11-16, *S. chrysopterum* entre 15-20, *S. viride* entre 12-16, y en *S. radians* y *S. rubripinne* entre 12-16. Sin embargo, aunque se podría usar estos caracteres para la discriminación entre estas especies, estas estructuras no son fáciles de observar debido al pequeño tamaño de los especímenes y a la fijación. La principal diferencia entre *S. radians* y *S. rubripinne* se registra en las larvas que aún poseen el saco vitelino, y es la presencia de una doble línea de pigmentos ubicados en la zona dorsal de *S. radians*, que la distingue de *S. rubripinne* la cual sólo posee una línea de pigmentos en la zona dorsal. Para los otros estadios larvales la información sobre los caracteres morfológicos que distinguen entre especies es escasa. No cuentan con descripciones detalladas sobre todos los estadios, y se desconoce la secuencia de desarrollo de las aletas en las tres especies.

En cuestiones esquemáticas *S. viride* carece de un esquema de su morfología, por el otro lado, las especies restantes (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum*, *S. radians* y *S. rubripinne*) si poseen esquemas, pero incompletos. Ninguno de los esquemas de las especies de *Sparisoma* posee uno que incluya todos los estadios larvales, y en cambio todas comparten el mismo esquema para las larvas en estadio de post flexión, lo cual evidencia la posible inexistencia de un carácter diagnóstico que ayude a discriminar entre estas especies.

Al analizar todos los especímenes identificados como *Sparisoma* spp., se observó coincidencia en los caracteres merísticos en larvas: el número de radios en aletas dorsales (IX-10), anales (III-9) y caudales (7+6, estos sólo se presenta en larva en post-flexión), además de la misma cantidad de miómeros totales(25), miómeros preanales (10), y miómeros post-anales (15). En patrones de pigmentación la mayoría de los especímenes presentaron el mismo patrón (71 de 72 especímenes). Con excepción de un espécimen que no presentó un pigmento en la zona, esta característica se atribuye a degradación del espécimen, debido a que no se observó en otro espécimen (Richard 2006). Otros caracteres merísticos como la cantidad de radios en las aletas pectorales no se lograron contabilizar debido al deterioro que sufrieron durante la colecta y la preservación de los organismos, el número de radios de la aleta pectoral no es un carácter morfológico esencial para la discriminación entre especies.

Se determinó que los 72 especímenes muestreados de *Sparisoma* están compuestos por al menos 4 especies (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians*). Se observó que esas 4 especies compartían los mismos caracteres merísticos, y se puede afirmar que caracteres merísticos como el número de miómeros y los patrones de pigmentación se presentan desde el estadio de preflexión y se mantienen hasta el estadio de transformación. (Richards 2006 & Parenti y Randall 2011).

Se determinó que las secuencias de los marcadores moleculares 16S y COI presentaron la resolución necesaria para la discriminación en nivel especie en especímenes del género *Sparisoma*. El tamaño de las secuencias de COI amplificadas para *Sparisoma* fue de 253 pb (las secuencias que se amplifican normalmente son de un tamaño mayor de 500 pb) y la secuencias de 16S se amplificó con un tamaño de 518 pb, sin embargo, el tamaño de la secuencia de COI no disminuyó su resolución. En cuestiones de polimorfismos se observó que las secuencias COI presentaron cantidad de polimorfismos similares a las de la secuencia 16S, con lo que se observó que la zona que se amplificó del COI es una zona variable por lo tanto el tamaño del COI no afectó la resolución de este marcador.

Todas las identificaciones moleculares realizadas con el análisis del marcador molecular COI coincidieron con las realizadas con el análisis con el marcador 16S. Al realizar los árboles filogenéticos de ambos marcadores moleculares, se observó que coincidieron en la topología, y que las ramas presentaron una porcentaje de robustez mayor al 90%, lo que garantiza la certeza de las identificaciones moleculares. Por otro lado, se observó que la cantidad de secuencias del marcador molecular 16S que se encuentran en la base de datos es menor al compararse a la cantidad de secuencias del marcador molecular COI, por lo que sólo se encontró una secuencia del 16S para *S. atomarium*, una para *S. aurofrenatum*, tres para *S. radians* y una para *S. radians*.

Estas especies identificadas molecularmente aumentan su robustez al contrastarlas con el trabajo de Valdez-Moreno et al. (2010) en donde se registró la presencia de larvas de *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians* en el canal de Yucatán. La zona de muestreo de este estudio corresponde a las estaciones Y2, Y3 y Y4 (fig. 13, fig. 14, fig. 15, fig. 16), en donde se corroboraron el registro de las especies anteriormente mencionadas, además se agrega el registro de la larva de *S. atomarium*.

A pesar de integrar las técnicas de identificación morfológica y molecular, y buscar caracteres diagnósticos que ayuden en la discriminación entre las larvas de estas especies (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians*), no se logró. Por lo anterior, se determinó que la identificación morfológica del género *Sparisoma* debe realizarse hasta el nivel de género, mientras que la identificación molecular independientemente del marcador molecular que se use (16S o COI) es la mejor opción para realizar una identificación certera en nivel de especie.

También se observó que en ambos marcadores (16S y COI) se presentaron una cantidad de polimorfismos parecida (Tabla VII y Tabla VIII) en las secuencias. Esto es interesante debido a que se observó que la sección de COI amplificada con los primers de Leray et al. (2013) resultó ser una zona muy variable y por lo tanto tiene la resolución necesaria para identificar hasta el nivel de especie, sin importar su menor tamaño con respecto al 16S.

## 4.2 Identificación de especímenes de *Bothus*

La identificación morfológica de especímenes del género *Bothus* se basó principalmente en la guía de Richards (2006), Evseenko y Nadtoka (2003), y Evseenko (2008). Se identificaron 34 especímenes de *B. ocellatus*. Se debe mencionar que en el género *Bothus* se encuentra la especie *B. robinsi* la cuál presenta caracteres merísticos parecidos a *B. ocellatus*, y es común que existe errores de identificación entre estas especies. Una de las características más importantes para la identificación de *B. ocellatus* y *B. robinsi* es la cantidad de miómeros totales y post-anales (Evseenko y Nadtoka 2003, Evseenko 2008), en principal problema en la identificación es que la cantidad de miómeros se sobrelapan entre estas dos especies, mientras que *B. ocellatus* presenta entre 35-37 miómeros totales (10 preanales y entre 25-27 post-anales), *B. robinsi* presenta entre 36-38 miómeros totales (10 preanales y entre 26-28 post-anales), esto también sucede en la cantidad de radios de la aleta dorsal y los radios de la aleta anal, todas las características anteriores se presentaron en todos los estadios larvales (Tabla 19).

**Tabla 19.** Caracteres merístico de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras pre y post-caudales (Evseenko and Nadtoke 2003, Richards 2006).

Especie	Dorsal	Pectoral	Pélvica	Anal	Caudal	Vértebras precaudales	Vértebra post-caudales
<i>B. ocellatus</i>	76-91	8-10	6	58-68	17	10	26(25-27)
<i>B. robinsi</i>	78-90	8-11	6	59-68	17	10	27(26-28)

Se determinó que se trataba de *B. ocellatus* por dos razones: primero por la probabilidad de que *B. ocellatus* presentara la cantidad de caracteres merísticos registrados en este trabajo, de acuerdo reportado por Evseenko y Nadtoke (2003) y Evseenko (2008): miómeros entre 35-38, radios dorsales entre 76-90 y radios anales entre 60-68. Existieron casos donde especímenes presentaban caracteres que eran probables en ambas especies (por ejemplo, número radios probable en *B. robinsi* y número de miómeros probable en *B. ocellatus*), en esos casos se tomó en cuenta a trabajos como Flores-Coto *et al.* (2009) y Valdez-Moreno *et al.* (2010) en los cuales son trabajos que se realizaron en la zona de estudio y en estos trabajos sólo registraron larvas de *B. robinsi* y no *B. ocellatus*. En otras especies del género *Bothus* como *B. lunatus* y *B. maculiferus*, presentan caracteres merísticos que se sobrelapan (tablas 20), pero en este caso la especie de *B. maculiferus* presenta una pigmentación característica que caracteriza a la especie los cuales son pigmentos localizados en cuatro puntos de los especímenes en la aleta dorsal y anal (Richards 2006).

**Tabla 20.** Caracteres merístico de *B. lunatus* y *B. maculiferus*, como radios y espinas de la aleta dorsal, pectoral, pélvica, anal y caudal, además del número de vértebras pre y post-caudales (Evseenko and Nadtoke 2003, Richards 2006).

Especie	Dorsal	Pectoral	Pélvica	Anal	Caudal	Vértebras precaudales	Vértebra post-caudales
<i>B. lunatus</i>	91-99	10-2	6	71-76	17	10	30
<i>B. maculiferus</i>	90-98	8-10	6	70-76	17	10	29-30

Al analizar las secuencias de marcador molecular COI y 16S se determinó que de los 17 especímenes identificados morfológicamente como *B. ocellatus*, sólo un espécimen se corroboró y 16 especímenes se identificaron como *B. robinsi*. La identificación molecular está sustentada por los dos

marcadores moleculares (COI y 16S, lo que da más robustez), ya que al hacer los alineamientos con las secuencias de bases de datos ambos marcadores dajinaron la misma especie (*B. robinsi* para 16 especímenes y *B. ocellatus* para un espécimen). En lo que respecta a la cantidad de secuencias del marcador molecular 16S de *B. ocellatus* y *B. robinsi* disponibles en las bases de datos, se observó que son escasas, para *B. ocellatus* sólo estaban disponibles tres secuencias en el GeneBank y para *B. robinsi* sólo una. Por el otro lado, las secuencias del marcador molecular COI para *B. ocellatus* tienen más secuencias que las que tienen las secuencias del marcador 16S, pero para *B. robinsi* sólo se encontró una secuencia en las bases de datos.

A pesar de la integración de las técnicas de identificación molecular y morfológica, no se encontraron caracteres diagnósticos que ayudaran a la discriminación entre *B. ocellatus* y *B. robinsi*. A partir de este resultado, se puede decir que hasta el momento no se hay una forma certera de discriminar entre *B. ocellatus* y *B. robinsi* por medio de la morfología, e incluso se puede inferir que en trabajos como el de Flores-Coto *et al.* (2009) y Valdez-Moreno *et al.* (2010), pueden tener registró de larvas de *B. robinsi* con una asignación de *B. ocellatus*, debido a que no se tiene registro de *B. robinsi* en la zona del sur del golfo de México. El posible registro erróneo de larvas de *B. robinsi* como *B. ocellatus* y viceversa, se había expuesto en trabajos como el trabajo de Evseenko y Nadtoka (2003), aunque no lo había podido comprobar por que su trabajo era morfológico. También el trabajo de Evseenko y Nadtoka (2003) se mencionó que posiblemente las descripciones de *B. ocellatus* no sean confiables debido a la posibilidad de que se hallan usado larvas de *B. robinsi* por error para elaborar las descripciones de *B. ocellatus* y viceversa.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la identificación molecular es la mejor opción para realizar una identificación certera en nivel especie en especímenes de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, independientemente si se utilizan secuencias de los marcadores moleculares COI o 16s.

### **4.3 Región v9 del 18S ribosomal**

La región v9 del 18S ribosomal resultó ser un marcador ineficaz para la identificación de larvas de peces en niveles taxonómicos de orden, familia, género y especie. Esto se pudo observar al realizar el árbol filogenético de las secuencias de la región V9 del 18S ribosomal. En el árbol filogenético se formaron clados con secuencias de especímenes de diferentes ordenes. La mayoría de las ramas presentaron porcentajes con soporte menores al 70%, lo que reduce la certeza de los clados formados. Por otro lado, hubo casos

en los que se formaron clados con secuencias de mismo orden con porcentajes de soporte mayores al 90%, lo cual aumenta la certeza de las ramas y dar la impresión de que las diferencias presentadas en esas secuencias son las suficientes para diferenciarse de las otras.

La segunda parte del estudio se enfocó en asignar un nivel taxonómico a las secuencias de de la región V9 del 18 ribosomal de los especímenes de peces. En el nivel de reino, filo y clase la mayoría de las secuencias se asignaron correctamente, solamente dos secuencias se asignaron erróneamente, en el nivel de filo a una de las secuencias se le asigno el filo Brachiopoda y a otra secuencia el filo Cnidaria, lo cual no coincidía con las identificaciones moleculares previamente realizadas con los marcadores moleculares 16S y COI. A partir de los niveles taxonómicos de orden la certeza de las asignaciones disminuyó, esto se observó al asignar a la mayoría de las secuencias el orden de perciformes y a ninguno se le asignó el orden de stomiiformes (en estudio había tres ordenes stomiiformes, pleuronectiformes y perciformes) y por presentar porcentajes de robustez menores a 85% en la mayoría de las asignaciones , esto se puede explicar a que el marcador molecular 18S es muy conservado y no tiene la resolución necesaria para discriminar en el nivel de orden.

Por último en el caso de asignación a niveles de familia, género y especie, las asignaciones no se pueden considerar confiables debido al bajo porcentaje de robustez calculado, además que en algunos casos se asignaron a las secuencias géneros y especies de organismos de agua dulce.

La falta de resolución de este marcador se atribuye principalmente a sus características. En primer lugar, este marcador posee una tasa de mutación menor que la de los genes 16S y COI, por lo que se puede definir como un marcador molecular más conservado. En otros trabajos como el de Zhang y Hanner (2012) se ha utilizado secuencias 18S (400-450 pb) y detectaron que en efecto es un marcador muy conservado al observar valores de distancias genéticas menores entre peces en comparación a los valores obtenidos de las distancias de 16S y COI. Por otro lado, también registraron que en algunos géneros de peces no se encontraron diferencias en las secuencias entre especies.

Independientemente de las características propias de la región V9 del 18S ribosomal, otra problemática es la escasa información existente de este marcador en peces. En la literatura sólo se logró encontrar un artículo donde se tuviera registro del uso de esta región en peces (Albaina et al. 2016). También se observó esta escasez de información en la base de datos de Silva al momento de hacer las asignaciones, las cuales en la mayoría de los casos asignaron géneros de peces de agua dulce.

## Capítulo 5. Conclusión

---

### 5.1 *Sparisoma*

El género *Sparisoma* es un grupo que presenta integrantes similares morfológicamente que dificulta la identificación morfológica de larvas en nivel de especie. Lo anterior ha ocasionado que exista escasa información sobre la morfología de los diferentes estadios larvales de las diferentes especies del grupo. A partir de este trabajo se determinó que la información morfológica disponible en las guías de identificación es suficiente para realizar identificaciones confiables en nivel de género. También se determinó que al menos cuatro especies del género (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians*) presentan caracteres merísticas iguales y no poseen un carácter diagnóstico que ayude en la identificación en nivel de especie. Por otro lado, se ha observado que las características merísticas que sirven para identificación morfológica en nivel género se mantienen desde el estadio de preflexión hasta el de post-flexión, lo cual indica que en el desarrollo larval no habrá cambios que puedan indicar una diferencia entre estas cuatro especies.

Uno de los aportes de este trabajo es el registro fotográfico de larvas en los tres estadios larvales (preflexión, flexión y postflexión) de *S. atomarium* y *S. radians*, y el registro fotográfico de larvas en dos estadios larvales (flexión y post-flexión) de *S. aurofrenatum* y *S. chrysopterum*. También se incrementó la información morfométrica de cada una de las especies anteriormente mencionadas. Con la nueva información se podrá complementar las descripciones y generar esquemas de cada especie.

Se determinó que la identificación molecular es la opción más confiable para realizar identificaciones en nivel de especie para el género *Sparisoma*. En el caso de las secuencias del marcador molecular 16S se observó que no existen una gran variedad de secuencias disponibles en las bases de datos genéticas, pero se demostró que las secuencias disponibles son suficientes para realizar identificaciones en nivel de especie certeras para el género *Sparisoma*. Se demostró que la resolución del este marcador molecular es suficiente para discriminación entre las cuatro especies con las que se trabajaron (*S. atomarium*, *S. aurofrenatum*, *S. chrysopterum* y *S. radians*). En el caso de las secuencias del marcador molecular COI observó que la cantidad de secuencias dentro de las bases de datos genéticas no es escasa. Se determinó que las secuencias de este marcador molecular aunque sean de menor tamaño a lo que normalmente se usa (>500 pb) posee la resolución necesario para realizar identificaciones a nivel de especie en el género *Sparisoma*.

La generación de las secuencias del marcador molecular 16S serán un gran aporte a las bases de datos al introducir 30 secuencias de las especies del género *Sparisoma*.

## 5.2 *Bothus*

La discriminación entre las especies de *B. ocellatus* y *B. robinsi* es una problemática derivada de sus caracteres merísticos y la inexistencia de una descripción formal de *B. robinsi*. Se determinó que la características descritas para diferenciar estas dos especies no son suficientes, y que la identificación morfológica debería llegar hasta el nivel de género.

Se puede inferir que la identificación entre estos organismos ha ocasionado que se produzcan registros erróneos de estas especies, también se aconseja que deben someterse revisiones de las descripciones de estas dos especies. No se encontró ningún carácter diagnóstico que se pudiera observar en los especímenes de *B. robinsi* que ayudara en la discriminación entre especies.

En cuestiones de generación de información con respecto a *B. ocellatus* sólo se realizó el registro fotográfico y morfométrico de un espécimen en flexión. Por el otro lado, de *B. robinsi* se obtuvo el registro fotográficos y la morfometría de especímenes en los diferentes estadios larvarios (preflexión, flexión y post-flexión), lo cual complementará las descripciones de este bótido.

En lo que respecta a las secuencias de los marcadores moleculares 16S y COI, se determinó que las secuencias disponibles *B. robinsi* en las bases de datos genéticas son mínimas, tan sólo registrándose una secuencia para el marcador molecular 16S y una para el marcador molecular COI. Independientemente de la cantidad de secuencias disponibles de ambos marcadores moleculares, se determinó que la información es suficiente para realizar indentificaciones certeras en nivel de especie para *B. robinsi* con ambos marcadores moleculares. En el caso de *B. ocellatus* la cantidad de secuencias del marcador molecular COI es suficiente para realizar un amplio análisis genético, pero en el caso de marcador molecular 16S, la información se reduce a tres secuencias disponibles, aunque son suficientes para realizar un identificación molecular certera.

Con este trabajo se realiza un incremento en el número de secuencias de las bases de datos genéticas disponibles. Además se determinó que la identificación morfológica no es la técnica adecuada

para realizar una discriminación entre estas dos especies y que se debe utilizar la identificación molecular para evitar errores en la identificación en nivel de especie.

### **5.3 Región V9 del 18S ribosomal**

Se determinó que la región V9 del 18S ribosomal no es un marcador con la resolución necesaria para realizar identificaciones a niveles de orden, familia, género y especie en peces. La resolución sólo permitió identificar en niveles de reino, filo y clase.

Se observó que las secuencias de las bases de datos en peces marinos del 18S ribosomal en general son escasas, por lo que dificulta más la identificación molecular. Por lo que se descarta este marcador para utilizarse en peces, tanto a nivel individual, como metagenómico.

## Literatura citada

---

- Ahlstrom EH, Butler JL, Sumida BY. 1976. Pelagic stromateoid fishes ( PISCES , PERCIFORMES ) of the eastern Pacific :kinds, distributions, and eary life histories and observations on five of these from the northwest Atlantic. *Bulletin of Marine Science* 26: 285–402.
- Albaina A, Aguirre M, Abad D, Santos M, Estonba A. 2016. 18S rRNA V9 metabarcoding for diet characterization: a critical evaluation with two sympatric zooplanktivorous fish species. *Ecology and Evolution* 6: 1809–1824.
- Álvarez-Cadena JN, Ordóñez-lópez U, Almaral-Mendivil AR, Uicab-Sabido MOA. 2007. Larvas de peces del litoral arrecifal del norte de Quintana Roo , Mar Caribe de México. *Hidrobiológica* 17: 139–150.
- Amaral-Zettler LA, McCliment EA, Ducklow HW, Huse SM. 2009. A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE* 4: .
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: D36–D42.
- Cawthorn DM, Steinman HA, Witthuhn RC. 2012. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa. *Gene* 491: 40–48.
- Collins RA, Cruickshank RH. 2012. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13: 969–975.
- Crisci JV. 1977. Clasificación biológica: Naturaleza, objetivos, fundamentos. *Journal of the Arnold Arboretum* 55: 51–61.
- Díaz-Viloria N, Sánchez-Velasco L, Lavín MF, Perez-Enriquez R, Jiménez-Rosenberg SPA, Godínez VM. 2015. Genetic corroboration of *Engraulis mordax* larvae in the upper Gulf of California , a previously undescribed spawning habitat. *Ichthyological Research* 62: 230–235.
- Díaz-Viloria N, Sánchez-Velasco L, Perez-Enrique R, Jiménez-Rosenberg S. 2013. Molecular identification and morphological description of totoaba *Totoaba macdonaldi* and *curvina* *Cynoscion reticulatus* preflexion larvae ( Perciformes : Sciaenidae ). *Ichthyological Research* 390–395.
- Ditty JG. 1988. Seasonality and depth distribution of larval fishes in the northern Gulf of Mexico above latitude 26°00'N. *Fishery Bulletin-National Oceanic and Atmospheric Administration* 86: 811–823.
- Espinosa-Pérez H. 2014. Biodiversidad de peces en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 450–459.
- Evseenko SA. 2008. Distribution and Routes of Drift Migrations in Larvae of Three Species of Flatfish *Bothus* ( *Bothidae* ) in Open Waters of the Northern Atlantic. *Journal of Ichthyology* 48: 825–843.
- Evseenko SA, Nadtoka E V. 2003. On the Identification of Flatfish Larvae of Two Closely Related Species of the Genus *Bothus* ( *Bothidae* ) from the Western Atlantic. *Journal of Ichthyology* 43: 572–574.
- Fahay MP. 1983. Guide of the early stages of marine fishes occurring in the wertern North Atlantic Ocena, Cape Hatteras to the Southern Scotian Shelf. *Northwest Atlantic Fishery Science* 4: 423.

- Fahay MP. 2007. Early stages of fishes in the western North Atlantic Ocean Davis Strait, Southern Greenland and Flemish Cap to Cape Hatteras. *Northwest Atlantic Fisheries Organization* 1: 1681.
- Flores-Coto C, Espinosa MDLL, Zavala FG, Sanvicente-Añorve L. 2009. Ictioplankton del sur del Golfo de México. *Un compendio. Hidrobiológica* 19: 49–76.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2017. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (06/2017)
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA. 2007. DNA barcoding : how it complements taxonomy , molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics* 23: 167–172.
- Harley EH. 2009. Evolutionary and molecular taxonomy. *Biological Science Fundamentals and Systematics* 2: 23.
- Haro JJ De, Melic AM. 1998. [Internet]. Available from: [http://sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN\\_23/B23-025-057.pdf](http://sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_23/B23-025-057.pdf)
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Jeremy R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313–321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: .
- Houde ED, Leak JC, Dowd CE, Berkeley SA, Richards WJ. 1979. Ichthyoplankton abundance and diversity in the eastern Gulf of Mexico. .
- Ivanova N V., Dewaard JR, Hebert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998–1002.
- Ivanova N V., Zemplak TS, Hanner RH, Hebert PDN. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544–548.
- Kendall AW, Ahlstrom EH, Moser HG. 1984. Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *Ontogeny and Systematics of Fishes* 11–22.
- Kim KC, Byrne LB. 2006. Global changes in terrestrial ecosystems Biodiversity loss and the taxonomic bottleneck : emerging biodiversity science. *Ecological Research* 794–810.
- Ko H, Wang Y, Chiu T, Lee M, Leu M, Chang K, Chen W, Shao K. 2013. Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding. *PLOS ONE* 8: 3–9.
- Kochzius M, Seidel C, Antoniou A, Botla SK, Campo D, Cariani A, Vazquez EG, Hauschild J, Hervet C, Hjörleifsdottir S, Hreggvidsson G, Kappel K, Landi M, Magoulas A, Marteinsson V, Nölte M, Planes S, Tinti F, Turan C, Venugopal MN, Weber H, Blohm D. 2010. Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS ONE* 5: 1–15.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 5112–5120.

- Leray M, Yang JY, Meyer CP, Mills SC, Agudelo N, Ranwez V, Boehm JT, Machida RJ. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in zoology* 10: 34.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, Jia G, Deng J, Wang C, Wang Q, Mei L, Lin X. 2014. Assessment of four DNA fragments ( COI , 16S rDNA , ITS2 , 12S rDNA ) for species identification of the Ixodida ( Acari : Ixodida ). *Parasites & vectors* 7: 93.
- Messing J. 1983. By In the summer of 1978 I began to circulate a manual for the use of M13mp2 and its derivatives that has been used in the Minnesota M13 lab- oratory courses and is the basis for this article . The revisions for this chapter include an updated list of sin. *Methods in Enzymology* 101: 20–78.
- Noriega JA, Santos AMC, Aranda SC, Calatayud J, Castro I De, Espinoza VR, Hórreo JL, Nagore G, Peláez ML, Hortal J. 2015. ¿Cuál es el alcance de la crisis de la Taxonomía ? Conflictos , retos y estrategias para la construcción de una Taxonomía renovada. *IDE@ - SEA* 9: 1–16.
- Packer L, Gibbs J, Sheffield C, Hanner R. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of. *Molecular Ecology Resources* 9: 42–50.
- Paine MA, Mcdowell JR, Graves JE. 2007. Specific identification of western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I ( COI ) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science* 80: 353–367.
- Palumbi SR. 1996. Nucleid Acids II: The polymerase chain reaction,. In: DM Hillis, C Moritz, and MA Mable, editor. *Molecular Systematics* Sunderland: Sinauer Associates. p. 205–247.
- Palumbi SR, Martin PA, McMillan WO, Romano S, Stice L, Grabowski G. 2002. The simple fool's guide to PCR version 2.
- Parenti P, Randall JE. 2011. Checklist of the species of the families Labridae and Scaridae: an update. *Smithiana Bulletin* 29–44.
- Ramadan HAI, Baeshen NA. 2012. Biological Identifications Through DNA Barcodes. In: G Lameed, editor. *Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World* InTech. p. 294.
- Richards WJ. 2006. *Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for the Western Central North Atlantic*, W.J. Richards. Two-volume set. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (2006). 2640 pp., Hardcover, Price: £226, US\$ 395, ISBN: 0-8493-1916-1.
- Sassa C, Hirota Y. 2013. Deep-Sea Research I Seasonal occurrence of mesopelagic fish larvae on the onshore side of the Kuroshio off southern Japan. *Deep-Sea Research Part I* 81: 49–61.
- Shulman MJ, Bermingham E. 1995. Early-Life Histories, Ocean Currents, and the Population-Genetics of Caribbean Reef Fishes. *Evolution* 49: 897–910.
- Strauss RE, Bond CE. 1990. Taxonomic Methods : Morphology. In: CB Schreck and PB Moyle, editor. *Methods for fish biology* Maryland: American Fisheries Society. p. 109–140.

- Teletchea F. 2009. Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19: 265–293.
- Valdez-Moreno M, Vásquez-Yeomans L, Elías-Gutiérrez M, Ivanova N V., Hebert PDN. 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: Potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research* 61: 665–671.
- Victor BC, Valdez-moreno M, Vásquez-yeomans L. 2015. Status of DNA Barcoding Coverage for the Tropical Western Atlantic Shorefishes and Reef Fishes. 3: 85–93.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261–5267.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia ' s fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 1847–1857.
- Wood S, Smith K, Banks J, Tremblay L, Rhodes L, Mountfort D, Cary S, Pochon X. 2013. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research Molecular genetic tools for environmental monitoring of New Zealand ' s aquatic habitats , past , present and the future. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 47: 37–41.
- Wu S, Xiong J, Yu YY. 2015. Taxonomic resolutions based on 18S rRNA Genes: A case study of subclass Copepoda. *PLoS ONE* 10: 1–19.
- Zhang J, Hanner R. 2012. Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea. *PLoS ONE* 7: 1–9.

## Anexos

### Anexo A

Método de extracción por medio de DNeasy kit Qiagen

- 1.- Se extrajo el ojo del lado derecho de la larva de pez (en caso de ser necesario se extraía el ojo del lado izquierdo o se utilizaba la cabeza completa) y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con alcohol al 96%.
- 3.- Se decantó el alcohol y se esperó a que todo el alcohol se evaporara.
- 4.- Al tubo eppendorf se le agregó 90  $\mu$ l de Buffer ATL y 10  $\mu$ l de proteinasa k. Para la digestión se incubó durante 3 horas, realizando un vortex de 30 segundos cada media hora.
- 5.- Se agregó 100  $\mu$ l de Buffer AL, se procedió a dar un vortex de 30 segundos a la mezcla, posteriormente se incubó a 56°C durante 10 minutos.
- 6.- Se agregó 100  $\mu$ l de etanol al 100%, se dio un vortex de 30 segundos a la muestra y se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm.
- 7.- El sobrenadante se traspasó a una columna y un tubo de colecta nuevo. Se centrifugó 1 minuto a 8,000 rpm. Se descartó el tubo colector y se utilizó uno nuevo.
- 8.- Se agregó 250  $\mu$ l de Buffer AW1. Se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm. Se colocó la columna en un tubo colector nuevo.
- 9.- Se agregó 250  $\mu$ l de Buffer AW2. Se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm. Se descartó el líquido del vaso colector y se repitió la centrifugación.
- 10.- Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 11.- El ADN se eludió agregando 10  $\mu$ l de Buffer AE en el centro de la columna. El ADN se incubó 5 minutos a -70°C y se centrifugó 2 minutos a 8,000 rpm.
- 12.- Se repitió el paso anterior.

## Anexo B

Concentraciones iniciales y finales de reactivos para la amplificación de COI, con los primers Ward et al. (2005).

Concentraciones y volúmenes de reactivos para realizar PCR			
Reactivo	[ ] Inicial	[ ] Final	Volumen
Buffer	5X	1X	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	5 µl
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.4 µl
Primer forward	10 µM	0.1 µM	0.2 µl
Primer reverse	10 µM	0.1 µM	0.2 µl
Polimerasa	5U	0.625 U	0.125 µl
ADN		12 - 41 ng	2 µl
H <sub>2</sub> O			8.075 µl
Total			20 µl

## Anexo C

Concentraciones iniciales y finales de reactivos para la amplificación de COI con los primers de Leray et al. (2013).

Concentraciones y volúmenes de reactivos para realizar PCR			
Reactivo	[ ] Inicial	[ ] Final	Volumen
Buffer	5X	1X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5 µl
Primer forward	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
Primer reverse	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
Polimerasa	5U	0.025 U	0.125 µl
ADN		5.9 – 40.7 ng	1 µl
H <sub>2</sub> O			15.88 µl
Total			25 µl

## Anexo D

Concentraciones iniciales y finales de los reactivos utilizados para la región 16S ARNr, con los primers Díaz-Viloria et al. (2013).

Concentraciones y volúmenes de reactivos para realizar PCR			
Reactivo	[ ] Inicial	[ ] Final	Volumen
Buffer	5X	1X	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	1.6 µl
dNTP's	10 mM	0.4 mM	0.8 µl
Primer forward	10 µM	0.2 µM	0.4 µl
Primer reverse	10 µM	0.2 µM	0.4 µl
Polimerasa	5U	1 U	0.2 µl
ADN		12 - 41 ng	2 µl
H <sub>2</sub> O			10.6 µl
Total			20 µl

## Anexo E

Concentraciones iniciales y finales de los reactivos utilizados para la amplificación de la región V9 del 18S ribosomal Amaral-Zettler et al. (2009).

Concentraciones y volúmenes de reactivos para realizar PCR			
Reactivo	[ ] Inicial	[ ] Final	Volumen
Buffer	5X	1X	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM	2.4 µl
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.4 µl
Primer forward	10 µM	0.2 µM	0.4 µl
Primer reverse	10 µM	0.2 µM	0.4 µl
Polimerasa	5U	0.5 U	0.1 µl
ADN		12 - 41 ng	2 µl
H <sub>2</sub> O			10.3 µl
Total			20 µl

## Anexo F

Morfometrías de especímenes identificados molecularmente de *Spaeisoma*.

Especie	Código	Estadio	LE	LPA	LC	LH	DO	AM
<i>S. aurofrenatum</i>	LGM-48*	Preflexión	2.86	1.67	0.52	N/A	N/A	0.67
<i>S. aurofrenatum</i>	LGM-16*	Post-flexión	5.6	3.27	0.9	0.24	0.24	1.02
<i>S. atomarium</i>	LGM-27*	Preflexión	2.72	1.43	0.39	N/A	N/A	0.57
<i>S. atomarium</i>	LGM-47*	Preflexión	2.57	1.34	0.44	N/A	N/A	0.47
<i>S. atomarium</i>	LGM-49*	Preflexión	2.69	1.73	0.84	N/A	N/A	0.66
<i>S. atomarium</i>	LGM-51*	Preflexión	2.67	1.48	0.43	0.14	0.14	0.43
<i>S. atomarium</i>	LGM-22*	Flexión	3.29	1.67	0.52	0.10	0.19	0.52
<i>S. atomarium</i>	LGM-29*	Flexión	4.70	2.51	0.90	0.26	0.26	0.82
<i>S. atomarium</i>	LGM-26*	Post-flexión	2.75	0.96	0.72	0.24	0.24	0.52
<i>S. atomarium</i>	LGM-30*	Post-flexión	5.19	2.65	0.90	0.28	0.27	0.87
<i>S. atomarium</i>	LGM-31*	Post-flexión	5.62	2.50	0.91	0.41	0.21	0.93
<i>S. atomarium</i>	LGM-32*	Post-flexión	5.08	2.67	0.97	0.25	0.27	0.93
<i>S. atomarium</i>	LGM-35*	Post-flexión	6.16	3.27	1.15	0.61	0.23	1.23
<i>S. atomarium</i>	LGM-39*	Post-flexión	3.24	1.76	0.57	0.19	0.15	0.46
<i>S. atomarium</i>	LGM-40*	Post-flexión	4.53	2.48	0.86	0.33	0.19	0.91
<i>S. atomarium</i>	LGM-54*	Post-flexión	7.94	4.39	1.31	0.56	0.37	1.68
<i>S. atomarium</i>	LGM-57*	Transformación	5.14	2.69	0.96	0.60	0.30	1.02
<i>S. chrysopterum</i>	LGM-21*	Preflexión	3.53	1.86	0.84	0.42	0.23	0.65
<i>S. chrysopterum</i>	LGM-19*	Post-flexión	6.07	3.27	1.30	0.46	0.31	1.30
<i>S. chrysopterum</i>	LGM-23*	Post-flexión	3.36	1.96	0.84	0.38	0.23	0.69
<i>S. radians</i>	LGM-50*	Preflexión	2.39	1.24	0.38	0.14	0.14	0.38
<i>S. radians</i>	LGM-53*	Flexión	5.97	2.91	0.77	0.38	0.23	0.77
<i>S. radians</i>	LGM-74*	Flexión	3.73	1.84	0.62	0.29	0.23	0.46
<i>S. radians</i>	LGM-88*	Flexión	4.17	2.13	0.79	0.33	0.23	0.75
<i>S. radians</i>	LGM-104*	Flexión	2.43	N/A	0.44	0.19	0.19	0.29
<i>S. radians</i>	LGM-108*	Flexión	4.29	2.14	0.62	0.28	0.39	0.66
<i>S. radians</i>	LGM-109*	Flexión	3.83	2.25	0.76	0.42	0.33	0.68
<i>S. radians</i>	LGM-118*	Flexión	6.03	3.1	1.01	0.48	0.48	0.97
<i>S. radians</i>	LGM-24*	Post-flexión	8.41	4.39	1.76	0.77	0.46	1.76
<i>S. radians</i>	LGM-25*	Post-flexión	8.59	4.67	1.92	1.23	0.54	1.69

## Anexo G

Morfometrías de especímenes identificados molecularmente de *Bothus*.

Espece	Código	Estadio	LE	LPA	LC	LH	DO	AM
<i>B. ocellatus</i>	LGM-14*	Post-flexión	4.45	1.79	1.15	0.42	0.30	2.89
<i>B. robinsi</i>	LGM-11*	Preflexión	1.47	0.57	0.40	0.17	0.093	0.55
<i>B. robinsi</i>	LGM-12*	Preflexión	2	1.33	0.85	0.29	0.25	0.93
<i>B. robinsi</i>	LGM-58*	Preflexión	5.26	1.50	0.30	0.42	0.30	2.51
<i>B. robinsi</i>	LGM-96*	Preflexión	4.35	1.73	1.23	0.42	0.34	2.68
<i>B. robinsi</i>	LGM-103*	Preflexión	3.28	1.82	0.94	0.29	0.36	1.63
<i>B. robinsi</i>	LGM-120*	Preflexión	4.20	2.11	1.20	0.46	1.82	0.29
<i>B. robinsi</i>	LGM-127*	Preflexión	N/A	N/A	N/A	0.35	0.25	2.34
<i>B. robinsi</i>	LGM-101*	Flexión	4.12	1.41	1.20	0.46	0.39	2.84
<i>B. robinsi</i>	LGM-13*	Post-flexión	3.75	N/A	1.34	0.43	0.34	2.69
<i>B. robinsi</i>	LGM-60*	Post-flexión	5.98	1.59	1.21	0.47	0.37	3.92
<i>B. robinsi</i>	LGM-62*	Post-flexión	6.54	1.96	1.59	0.65	0.37	4.11
<i>B. robinsi</i>	LGM-63*	Post-flexión	5.98	2.34	1.49	0.47	0.37	3.46
<i>B. robinsi</i>	LGM-94*	Post-flexión	8.30	2.11	2.30	0.90	0.53	6.21
<i>B. robinsi</i>	LGM-100*	Post-flexión	6.87	1.94	1.68	0.63	0.45	4.78
<i>B. robinsi</i>	LGM-102*	Post-flexión	8.55	2.78	2.31	0.63	0.52	6.48
<i>B. robinsi</i>	LGM-130*	Post-flexión	5.85	1.87	1.73	0.55	0.43	3.71

## Anexo H

Resultados de los alineamientos de las secuencias de los especímenes identificados como *Sparisoma spp.* (E-value, % de cobertura e identidad) usando el marcador molecular 16S, además de la identificación molecular.

Espécimen	Identificación morfológica	Estadio	Identificación molecular	E-value	% de cobertura	Identidad
LGM-48	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. aurofrenatum</i>	0	93%	99%
LGM-16	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. aurofrenatum</i>	0	93%	99%
LGM-27	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-47	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-49	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-51	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-22	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-29	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-26	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-30	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-31	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-32	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-35	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-39	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-40	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-54	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-57	<i>Sparisoma spp.</i>	Transformación	<i>S. atomarium</i>	0	90%	99%
LGM-21	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. chrysopterum</i>	0	98%	100%
LGM-19	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. chrysopterum</i>	0	98%	100%
LGM-23	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. chrysopterum</i>	0	98%	100%
LGM-50	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-53	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-74	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-88	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-104	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-108	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	90%	99%
LGM-109	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-118	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	0	89%	99%
LGM-24	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. radians</i>	0	90%	100%
LGM-25	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. radians</i>	0	90%	100%

## Anexo I

Resultados de los alineamientos de las secuencias de los especímenes identificados como *Sparisoma spp.* (E-value, % de cobertura e identidad) usando el marcador molecular COI con los primer de Leray et al. (2013), además de la identificación molecular.

Espécimen	Identificación morfológica	Estadio	Identificación molecular	E-value	% de cobertura	Identidad
LGM-48	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. aurofrenatum</i>	100%	100%	98%
LGM-16	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. aurofrenatum</i>	5e-112	100%	96%
LGM-31	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	1e-118	100%	98%
LGM-32	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. atomarium</i>	6e-126	100%	99%
LGM-21	<i>Sparisoma spp.</i>	Preflexión	<i>S. chrysopterum</i>	2e-121	98%	99%
LGM-23	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. chrysopterum</i>	6e-121	100%	98%
LGM-88	<i>Sparisoma spp.</i>	Flexión	<i>S. radians</i>	6-116	100%	97%
LGM-25	<i>Sparisoma spp.</i>	Post-flexión	<i>S. radians</i>	1e-112	100%	96%

## Anexo J

Resultados de los alineamientos de las secuencias de los especímenes de los especímenes identificados como *Bothus ocellatus* (E-value, % de cobertura e identidad) usando el marcador molecular 16S, además de la identificación molecular.

Espécimen	Identificación morfológica	Estadio	Identificación molecular	E-value	% de cobertura	Identidad
LGM-11	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-12	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-58	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-14	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. ocellatus</i>	0	100%	98%
LGM-13	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-60	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-62	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-63	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%

## Anexo K

Resultados de los alineamientos de las secuencias de los especímenes de los especímenes identificados como *Bothus ocellatus* (E-value, % de cobertura e identidad) usando el marcador molecular COI amplificado con los primers de Ward et al. (2005), además de la identificación molecular.

Espécimen	Identificación morfológica	Estadio	Identificación molecular	E-value	% de cobertura	Identidad
LGM-11	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-12	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-58	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-96	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-103	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-120	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-127	<i>B. ocellatus</i>	Preflexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-101	<i>B. ocellatus</i>	Flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-14	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. ocellatus</i>	0	100%	99%
LGM-13	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-60	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-62	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-63	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-94	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-100	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-102	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%
LGM-130	<i>B. ocellatus</i>	Post-flexión	<i>B. robinsi</i>	0	100%	99%

## Anexo L

Secuencias que se obtuvieron de bases de las bases de datos de GenBank y BOLD System y se utilizaron en este trabajo. Gi: Número de identificación.

#	Marcador	Especie	Gi	Base de datos
1	16S	<i>L. maximus</i>	194350862	GenBankI
2	16S	<i>L.maximus</i>	22597032	GenBank
3	16S	<i>L.maximus</i>	58198994	GenBank
4	16S	<i>S. atomarium</i>	4028885	GenBank
5	16S	<i>S. aurofrenatum</i>	21238800	GenBank
6	16S	<i>S. aurofrenatum</i>	4028883	GenBankI
7	16S	<i>S. chrysopterum</i>	4028887	GenBank
8	16S	<i>S. chrysopterum</i>	33569627	GenBank
9	16S	<i>S. chrysopterum</i>	21238801	GenBank
10	16S	<i>S. radians</i>	4028889	GenBank
11	COI	<i>S. atomarium</i>	297525740	GenBank
12	COI	<i>S. atomarium</i>	297525742	GenBank
13	COI	<i>S. atomarium</i>	297525746	GenBankI
14	COI	<i>S. atomarium</i>	297525748	GenBank
15	COI	<i>S. atomarium</i>	BZLWA476-06	BOLD
16	COI	<i>S. aurofrenatum</i>	297524836	GenBank
17	COI	<i>S. aurofrenatum</i>	393005409	GenBank
18	COI	<i>S. aurofrenatum</i>	293004634	GenBank
19	COI	<i>S. aurofrenatum</i>	584296909	GenBankI
20	COI	<i>S. aurofrenatum</i>	BAHA231-08	BOLD
21	COI	<i>S. aurofrenatum</i>	BAHC001-13	BOLD
22	COI	<i>S. chrysopterum</i>	297525732	GenBankI
23	COI	<i>S. chrysopterum</i>	LIDM288-07	BOLD
24	COI	<i>S. chrysopterum</i>	LIDM480-07	BOLD
25	COI	<i>S. radians</i>	297524842	GenBankI
26	COI	<i>S. radians</i>	297525734	GenBank
27	COI	<i>S. radians</i>	297525736	GenBank
28	COI	<i>S. radians</i>	297524840	GenBank
29	COI	<i>S. radians</i>	297524838	GenBank
30	COI	<i>S. radians</i>	BAHIA102-14	BOLD
31	COI	<i>S. radians</i>	BAHA150-08	BOLD
32	COI	<i>L. maximus</i>	297524733	GenBank
33	COI	<i>L. maximus</i>	297524733	GenBank
34	COI	<i>L. maximus</i>	297524735	GenBank
35	16S	<i>B. ocellatus</i>	38350361	GenBank
36	16S	<i>B. ocellatus</i>	66276666	GenBank
37	16S	<i>B. robinsi</i>	444292811	GenBank

## Continuación. Anexo L

#	Marcador	Especie	Gi	Base de datos
38	16S	<i>B.robinsi</i>	22532205	GenBank
39	16S	<i>S. papillosum</i>	22532199	GenBank
40	16S	<i>S. papillosum</i>	38350364	GenBank
41	16S	<i>S. papillosum</i>	66276668	GenBank
42	COI	<i>B. robinsi</i>	UKFBK123-08	BOLD System
43	COI	<i>B. ocellatus</i>	297525096	GenBank
43	COI	<i>B. ocellatus</i>	297525108	GenBank
42	COI	<i>B. ocellatus</i>	297525104	GenBank
43	COI	<i>B. ocellatus</i>	297525092	GenBank
44	COI	<i>B. ocellatus</i>	297525106	GenBank
45	COI	<i>B. ocellatus</i>	297525100	GenBank
46	COI	<i>B. ocellatus</i>	MFL055-06	BOLD
47	COI	<i>S. papillosum</i>	297525764	GenBank
50	COI	<i>S. papillosum</i>	297525766	GenBank
51	COI	<i>S. papillosum</i>	297525768	GenBank
52	18S	<i>Carcharhiniformes</i>	897591237	GenBank