



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**IDENTIFICACIÓN DE LARVAS DE PECES DE LA
FAMILIA SCIAENIDAE DEL ALTO GOLFO DE
CALIFORNIA, MEDIANTE MARCADORES
MOLECULARES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

ROSABEL CAMACHO GASTÉLUM

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de noviembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"IDENTIFICACIÓN DE LARVAS DE PECES DE LA FAMILIA SCIAENIDAE
DEL ALTO GOLFO DE CALIFORNIA, MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES"

Presentada por el alumno:

<u>CAMACHO</u> Apellido paterno	<u>GASTÉLUM</u> materno	<u>ROSABEL</u> nombre(s)							
Con registro: <table border="1"> <tr> <td>A</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>3</td> </tr> </table>			A	1	3	0	3	4	3
A	1	3	0	3	4	3			


Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

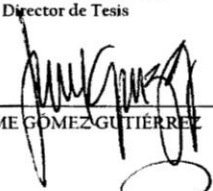
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

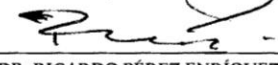
Directores de Tesis



DR. NOÉ DÍAZ VILORIA
Director de Tesis



DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ



DR. RICARDO PÉREZ ENRÍQUEZ



DRA. LAURA SÁNCHEZ VELASCO
2º. Directora de Tesis



DRA. SYLVIA PATRICIA ADELHEID JIMÉNEZ
ROSENBERG

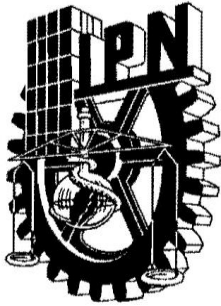
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 20 del mes noviembre del año 2014
el (la) que suscribe BM. ROSABEL CAMACHO GASTÉLUM alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A130343 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. NOÉ DÍAZ VILORIA Y DRA. LAURA SÁNCHEZ VELASCO

y cede los derechos del trabajo titulado:

“IDENTIFICACIÓN DE LARVAS DE PECES DE LA FAMILIA SCIAENIDAE
DEL ALTO GOLFO DE CALIFORNIA, MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES”

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

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

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

BM. .ROSABEL CAMACHO GASTÉLUM

nombre y firma

“Si quieres ser sabio, aprende a interrogar razonablemente, a escuchar con atención, a responder serenamente y a callar cuando no tengas nada que decir (Johann Kaspar Lavater).”

DEDICATORIA

A mis padres Rosabel Gastélum Rocha y Nicolás Camacho Acevedo, por su innumerable apoyo.

A mi hermana Verónica: por escucharme siempre aunque a veces no entienda lo que le digo.

Sin olvidar a los más pequeños de mi familia, a los traviosos de la casa, a mis sobrinas y sobrinos, que con sus risas hacen olvidar los problemas cotidianos.

“Cuando nuestros sueños se han cumplido es cuando comprendemos la riqueza de nuestra imaginación y la pobreza de la realidad (Ninon de Lenclos).”

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por abrirme sus puertas para formar parte de esta institución y permitirme llevar a cabo la realización de esta tesis.

Al CONACYT por otorgarme la beca de maestría durante el periodo de terminación de esta 2012-2014.

Al proyecto “Asociaciones de larvas de peces, hábitat trófico y su relación con la estructura física en giros del Golfo de California” (SEP-CONACYT 2008-1 105922) de la Dra. Laura Sánchez Velasco.

Al programa institucional de formación de investigadores del IPN-CICIMAR y a los proyectos SIP del IPN “Identificación molecular de especies indicadoras de hábitats en el Golfo de California” (Clave 20130302) e “Identificación molecular de especies de las familias Scombridae (*Auxis* spp.), Albulidae (*Albula* sp.) y Clupeidae (*Opisthonema* spp.), en larvas de peces del Golfo de California” (Clave 20140752), a cargo del Dr. Noé Díaz Viloría, por permitirme tener una Beca “BEIFI”.

A mis directores de Tesis el Dr. Noé Díaz Viloría y la Dra. Laura Sánchez Velasco por aceptarme y aguantarme durante mi pequeña estancia de maestría (jejeje), por todos los consejos brindados que ayudaron en la realización y conclusión de este trabajo. Sobre todo, un gracias (especial) por darme todo su apoyo personal en cada circunstancia que se presentaba y permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A los miembros de mi comité: Dra. Patricia Jiménez Rosenberg, Jaime Gómez Gutiérrez y Ricardo Pérez Enríquez por enriquecer este trabajo con sus correcciones. Un agradecimiento especial a la Dra. Paty por tenerme paciencia brindándome su tiempo y conocimiento en la identificación de larvas de Sciaenidae y al Dr. Ricardo Pérez Enríquez y a Susana Ávila Álvarez por permitirnos realizar los análisis genéticos en el laboratorio seco de Genética Acuícola del CIBNOR.

A Philip A. Hastings y H. J. Walker de SIO (SCRIPPS INSTITUTION OF OCEANOGRAPHY) quienes donaron tejidos de ejemplares de *Cynoscion othonopterus*, *Larimus pacificus*, *Menticirrhus elongatus* y *Micropogonias megalops*

(uno de cada uno). Al Dr. José M. Grijalva Chon de USON quien donó tejidos de cinco especímenes de *M. megalops*.

Al Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos y en especial a Caroline Downton por su ayuda en la colecta de especímenes adultos en Puerto Peñasco y Golfo de Santa Clara, en el Alto Golfo de California.

A las cooperativas de Puerto Peñasco, especialmente al Sr. Carlos Pino Montoya de la Cooperativa S.P.R.L. Unidad de Productores del Borrascoso y al Sr. Rafael Peñuelas Machucas de la S.C.P.P. "Las Collas" S.C. de R.L. de C.V. por proporcionarnos especímenes adultos de la familia Sciaenidae.

Se agradece la disponibilidad de ejemplares y referencias de larvas de peces a la Colección científica de huevos y larvas de peces del Pacífico Mexicano (acrónimo: ICTIOPLANCTON) Clave B.C.S. INV-1196-06-071 y al Dr. José De La Cruz Agüero de CICIMAR quien verificó las identificaciones de los peces adultos.

Al grupo de trabajo (Plancton) de la Dra. Laura Sánchez: Ethel, Marijose, Roció Susan, Adalberto, Amaru, Arturo, Eric, Fernando, Franz y Javier. Gracias por coleccionar el material biológico con el que se llevó a cabo esta tesis, por todos sus comentarios y sugerencias que me ayudaron a mejorar el presente trabajo y también por esas reuniones donde podíamos convivir y despejarnos del estrés de la maestría.

A la comisión de operación y fomento de actividades académicas del IPN (COFAA) por apoyos otorgados para congresos.

A mis compañeros y amigos del aula seis: Cris, Hisol, Isa, María, Marijose, Moni, Olinda, Tere, Vane, Aldo, Amaru, Ramón, Sergio y Tamayo, por aguantar los momentos de estrés que surgían durante la época de presentaciones que luego desquitábamos con "reuniones".

A mis amigos: Hisol, Rosi, Isabel, Eva, Geremías, Amaru, Aldo y Felipe muchas gracias por hacerme formar parte de su vida.

Un agradecimiento especial a Armando por ser mi amigo y maestro en el manejo del Corel-Draw. A C.P. Humberto Ceseña y Cesar Casas, por toda la ayuda en los trámites administrativos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
GLOSARIO	V
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Identificación taxonómica de larvas de peces de Sciaenidae.....	4
2.2. Identificación genética de larvas de peces	5
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. HIPÓTESIS	7
5. OBJETIVOS.....	7
5.1. Objetivo general.	7
5.2. Objetivos particulares.....	7
6. ÁREA DE ESTUDIO	8
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
7.1. Muestreos.....	10
7.2. Identificación de larvas de peces y especímenes adultos.....	11
7.3. Análisis genético	12
7.3.1. Extracción de ADN.....	12
7.3.2. Amplificación (PCR).	13
7.3.3. Análisis de secuencias	14
7.4. Caracterización de las larvas de las especies identificadas genéticamente.	15
8. RESULTADOS.....	18
8.1. Identificación morfológica	18
8.2. Análisis genético	20
8.3. Descripción de larvas de la familia Sciaenidae	27
8.3.1. Análisis morfométrico.	27
8.3.2. Descripción de las especies	31
8.4. Número de larvas totales y presencia en las estaciones de muestreo.	48
9. DISCUSIÓN	50

9.1. Identificación taxonómica de larvas de Sciaenidae.....	50
9.2. Identificación genética.....	51
9.3. Descripción de especies de Sciaenidae.....	54
9.4. Distribución.....	59
10. CONCLUSIONES.....	60
11. RECOMENDACIONES.....	61
12. BIBLIOGRAFÍA.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** División del Golfo de California con base en sus características batimétricas y oceanográficas: a) Zona de entrada, b) Sur del Golfo de California (SGC), c) Archipiélago o zona de las grandes islas, d) Norte del Golfo de California (NGC), e) Alto Golfo de California (AGC). Mapa tomado y modificado de Lavín & Marinone (2003). 9
- Figura 2.** División del Alto Golfo de California: C) zona núcleo, B) zona de amortiguamiento y V) refugio de la vaquita marina, tomado y modificado de Sánchez Velasco *et al.* (2012). 9
- Figura 3.** Red de estaciones de plancton (puntos negros) y sitios de recolecta de especímenes adultos (rombos rojos) en el Alto Golfo de California. 11
- Figura 4.** Diagrama conceptual de larva de pez con las características morfométricas medidas a cada una de las larvas, Longitud Notocordal (LN), Longitud Hocico-Ano (LPA), Longitud Postanal (LPS), Longitud Cefálica (LC), Longitud Hocico (LH), Diámetro del Ojo (DO) y Altura del cuerpo (AM). Imagen tomada y modificada de Jiménez-Rosenberg (1998). 16
- Figura 5.** Esquema conceptual de larva de pez con los patrones de pigmentación considerados en cada una de las larvas. 16
- Figura 6.** Fotos de morfotipos larvarios de la familia Sciaenidae, colectados en el AGC. 19
- Figura 7.** Árbol NJ basado en la fracción COI (486 pb), los valores de las ramas indican el soporte de las agrupaciones después de 5000 réplicas de re-muestreo. L = larva, A = Adulto. 25
- Figura 8.** Árbol NJ basado en la fracción 16S (482 pb), los valores de las ramas indican el soporte de las agrupaciones después de 5000 réplicas de re-muestreo. L = larva, A = Adulto. 26
- Figura 9.** Análisis discriminante de las proporciones corporales de las especies: *Cynoscion othonopterus* (azul), *Cynoscion reticulatus* (verde), *Micropogonias megalops* (rojo) y *Menticirrhus nasus* (rosa). Centroides (amarillo). 28
- Figura 10.** Análisis discriminante con tres proporciones corporales (LC/LN, AM/LN y LPS/LN) de las especies: *Cynoscion othonopterus* (azul), *Cynoscion reticulatus*

(verde), <i>Micropogonias megalops</i> (rojo) y <i>Menticirrhus nasus</i> (rosa). Centroides (amarillo).	30
Figura 11. Larvas de <i>Micropogonias megalops</i> en preflexión (1.8 mm), flexión (2.7 mm) de LN y postflexión (4.00 mm) de longitud total.	35
Figura 12. Larva de <i>Menticirrhus nasus</i> en estadio de preflexión (1.4 mm de LN). Vista en posición lateral (A), ventral (B) y dorsal (C).	38
Figura 13. Larva de <i>Menticirrhus nasus</i> en estadio de postflexión (6.2 mm de LN), vista lateral (A), dorsal (B) y ventral (C).	40
Figura 14. Larva de <i>Cynoscion othonopterus</i> en estadio de preflexión (1.5 mm de LN). Vista en posición lateral (A), ventral (B) y dorsal (C).	43
Figura 15. Larva de <i>Cynoscion othonopterus</i> en estadio de postflexión (3.50 mm de longitud total). Vista en posición lateral (A) y ventral (B).	44
Figura 16. Larva de <i>Cynoscion reticulatus</i> en estadio de preflexión (1.3 mm de LN). Vista en posición lateral (A), ventral (B) y dorsal (C).	47
Figura 17. Porcentaje de larvas de cada especie <i>Cynoscion reticulatus</i> (C.r), <i>Micropogonias megalops</i> (M.m), <i>Menticirrhus nasus</i> (M.n) y <i>Cynoscion othonopterus</i> (C.o) en las estaciones de muestreo.	48
Figura 18. Mapas de presencia (pentágono negro)-ausencia (cruces) de las especies de Sciaenidae en las estaciones de muestreo: C) zona núcleo, B) zona de amortiguamiento y pentágono (rojo) refugio de la vaquita marina.	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de Sciaenidae reportadas en el Alto Golfo y el Golfo de California.	2
Tabla 2. Juegos de iniciadores propuestos para la amplificación de COI y 16S.....	13
Tabla 3. Porcentajes promedios de divergencias genéticas de las fracciones COI (debajo de la diagonal) y 16S (arriba de la diagonal), entre los morfotipos larvarios encontrados en el AGC.	22
Tabla 4. Porcentajes de divergencia genética inter-específica de la fracción COI, entre las secuencias de los morfotipos larvarios encontrados en el AGC y secuencias de especies (adultos) recolectadas en la zona.....	23
Tabla 5. Porcentajes de divergencia genética inter-específica de la fracción 16S, entre las secuencias de los morfotipos larvarios encontrados en el AGC y secuencias de especies (adultos) recolectadas en la zona.....	24
Tabla 6. Asignación de especies a cada uno de los morfotipos (mediante análisis genético).....	27
Tabla 7. Intervalos de tallas (en milímetros) de las etapas larvarias de las especies identificadas.	28
Tabla 8. Matriz de clasificación de las especies identificadas, utilizando seis proporciones (LC/LN, AM/LN, LPA/LN, LPS/LN, DO/LC y H/LC) corporales de larvas en estadio de preflexión.	29
Tabla 9. Proporciones utilizadas en el análisis discriminante para las cuatro especies: <i>Cynoscion othonopterus</i> , <i>Cynoscion reticulatus</i> , <i>Micropogonias megalops</i> y <i>Menticirrhus nasus</i>	30
Tabla 10. Matriz de clasificación de las especies identificadas, utilizando tres proporciones corporales (LC/LN, AM/LN y LPS/LN) de larvas en estadio de preflexión.....	31
Tabla 11. Proporciones corporales promedio y desviación estándar, de larvas de <i>Micropogonias megalops</i> . n = número de larvas.....	32
Tabla 12. Datos merísticos de los estadios tempranos de <i>Micropogonias megalops</i>	33

Tabla 13. Proporciones corporales promedio y desviación estándar de larvas de <i>Menticirrhus nasus</i> . <i>n</i> = número de larvas.....	36
Tabla 14. Datos merísticos de los estadios tempranos de <i>Menticirrhus nasus</i>	37
Tabla 15. Proporciones corporales promedio y desviación estándar de larvas de <i>Cynoscion othonopterus</i> . <i>n</i> = número de larvas.	41
Tabla 16. Datos merísticos de los estadios tempranos de <i>Cynoscion othonopterus</i>	42
Tabla 17. Proporciones corporales promedio y desviación estándar de larvas de <i>Cynoscion reticulatus</i> . <i>n</i> = número de larvas.....	45
Tabla 18. Intervalos de tallas en milímetros de las etapas larvarias en las especies encontradas y otras especies de Sciaenidae descritas por diferentes autores.	55
Tabla 19. Características diagnosticas (pigmentación) de las larvas de Sciaenidae reportadas en este estudio.....	58

GLOSARIO

Cebador: Iniciador o *primer*, es una secuencia corta de ADN de hebra sencilla o ARN que sirve como punto de inicio para el copiado de secuencias plantilla en PCR.

Congéneres o congéneres: Especies que son miembros del mismo género.

Divergencia genética: Es el cambio en la frecuencia de los alelos del patrimonio genético de una población debido a los diferentes mecanismos de evolución. Es decir, grado de variación que existe entre los genes de cada especie. O bien una expresión de genes totalmente diferentes entre las fuentes, originadas por el aislamiento geográfico, ancestral y selección en diferentes ambientes.

Electroforesis: Técnica para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido o bien a través de una matriz porosa.

Estadio larvario: Periodo en el ciclo de desarrollo de los animales, que va desde la eclosión del huevo hasta la etapa de transformación.

Flexión: Estadio larval donde la parte distal del notocordio se flexiona y empiezan a formarse los elementos hipurales y para-hipurales.

Huesos hipurales: Elementos óseos que forman parte de la placa hipúrica y que sirven para la inserción de los radios de la aleta caudal.

Miómero: Paquetes musculares insertados en el esqueleto a lo largo del tronco de las larvas que posteriormente darán origen a los miotomos.

Morfotipo: En taxonomía, ejemplar elegido para ilustrar una variación morfológica dentro de una población de una especie. Categoría en la que un individuo es

clasificado de acuerdo con sus formas (por ejemplo., tamaño del cuerpo, pigmentación etc.).

Notocordio: Notocorda; eje celular elástico formado bajo el cordón nervioso en el embrión primitivo de todos los cordados. Posteriormente se sustituye o se rodea por las vértebras en la mayor parte de los vertebrados.

Opérculo: Hueso laminar de origen dérmico que cubre las cavidades branquiales de los peces.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es un procedimiento *in vitro* que permite amplificar secuencias de ADN específicas a partir de pequeñas cantidades de ADN. La PCR es una reacción en cadena de 25 a 35 ciclos. Cada ciclo, que involucra tres reacciones rigurosamente controladas en tiempos y temperatura: 1) desnaturalización del ADN de cadena doble, a alrededor de 93-95°C, 2) hibridación del cebador a unos 50-70°C y 3) síntesis de ADN, que utiliza una ADN polimerasa termoresistente, típicamente a unos 70-75°C. Al final, hay al menos 10^5 copias de la secuencia blanco específica.

Postflexión: Estadio en larvas de peces en donde el notocordio se encuentra flexionado completamente y los elementos hipurales presentan mayor grado de osificación.

Preflexión: Estadio en larvas de peces que comienza con la terminación de la etapa de saco vitelino y finaliza con la flexión inicial del notocordio.

Preopérculo: Hueso laminar que cubre la rama preopercular del canal mandibular de los peces.

TE: Solución amortiguadora del pH comúnmente empleada en biología molecular, especialmente para procedimientos que buscan proteger al DNA o RNA.

Tipo: Es un ejemplar de una especie dada sobre el cual se ha realizado la descripción de la misma y que de ese modo valida la publicación de un nombre científico para dicha especie.

RESUMEN

La identificación taxonómica de larvas de peces de la familia Sciaenidae a nivel de especie no es precisa debido a las similitudes morfológicas que presentan entre ellas. En este trabajo se identificaron y describieron larvas de Sciaenidae del Alto Golfo de California (AGC) a nivel de especie mediante análisis morfométrico y genético. Para esto se recolectaron larvas en el AGC con una red cónica (505 μm) mediante arrastres superficiales durante septiembre del 2012, se identificaron a nivel de familia y se pre-clasificaron en cuatro morfotipos larvarios de acuerdo a sus características externas. Se amplificaron las fracciones citocromo c oxidasa subunidad I (COI) Y 16S ARNr (16S) del ADN mitocondrial en cinco larvas de cada morfotipo. Se calcularon los porcentajes de divergencia genética y se construyeron árboles del Vecino más Cercano (NJ). Se tomaron las medidas corporales de 145 larvas en preflexión de los cuatro morfotipos para un análisis discriminante. Como resultado se obtuvo la identificación genética de cuatro especies: *Micropogonias megalops*, *Menticirrhus nasus*, *Cynoscion othonopterus* y *Cynoscion reticulatus*, con divergencias genéticas intra-específicas $< 1\%$ e inter-específicas $> 5\%$ con un soporte estadístico de re-muestreo del 100% en COI y $> 83\%$ en 16S en los arboles (NJ). El análisis discriminante mostró que las larvas de cada una de las especies compartían características morfométricas entre sí, con una matriz de clasificación de 62.76% ($p=0.000$). El patrón de pigmentación permitió la diferenciación de dos de ellas (*Menticirrhus nasus* y *Micropogonias megalops*), pero no permitió la identificación precisa de *Cynoscion reticulatus* y *Cynoscion othonopterus* en preflexión. No obstante a que las proporciones morfométricas no ayudaron en la diferenciación de las especies presentes en este estudio, el análisis genético permitió la identificación precisa de cuatro morfotipos a nivel de especie. Por lo que, la combinación de análisis morfológicos y genéticos en estudios taxonómicos son de vital importancia, tanto en la identificación de estadios tempranos como de adultos, para la correcta identificación de especies que comparten características entre sus congéneres.

ABSTRACT

Taxonomic identification of fish larvae of family Sciaenidae to species level is not accurate due to the morphological similarities present among them. In this study Sciaenidae larvae collected from the Upper Gulf of California (AGC) were identified and described based on morphological and genetic analysis. Fish larvae were sampled from the AGC during September 2012 using a conical net (505 μm) through surface tows. Sampled organisms were identified to the family level and classified in four morphotypes based on external characteristics. Two fractions of the mitochondrial DNA, Cytochrome c oxidase subunit I (COI) and 16S rRNA (16S) were amplified in at five larvae of each morphotype. Percentage of genetic divergence was calculated and the neighbor-joining (NJ) method was applied to reconstruct phylogenetic trees. Body measurements of 145 larvae in preflexion were recorded and data was analyzed statistically using discriminant analysis. Results indicated the genetic identification of four species: *Micropogonias megalops*, *Menticirrhus nasus*, *Cynoscion othonopterus*, and *Cynoscion reticulatus*, with intraspecific genetic divergences $<1\%$ and interspecific divergences $>5\%$, and a statistical support of bootstrap in the NJ trees of 100% in COI and 83% in 16S. Results from discriminant analysis suggested that morphometric characteristics are shared among larvae species, with a classification matrix of 62.76% ($p=0.000$). However, considering pigmentation patterns the present study was able to distinguish two species (*Menticirrhus nasus* and *Micropogonias megalops*). This result could also be misleading to identify other species such as *Cynoscion reticulatus* and *Cynoscion reticulatus* at early stages (preflexion). Despite the fact morphometric proportions did not allow the distinction among species, an accurate identification to level species in the four morphotypes was obtained based on genetic analysis. Therefore, both morphological and genetic analysis are important in taxonomic studies of fish, particularly when identifying fish larvae during early stages or as adults, which share similar characteristics among congeners.

1. INTRODUCCIÓN

La identificación de especies en peces se basa tradicionalmente en sus características morfológicas externas, incluyendo la forma del cuerpo, los patrones de pigmentación, el número y la posición relativa de las aletas, el número y tipo de radios de la aleta, así como varias mediciones relativas del cuerpo (Strauss y Bond, 1990). Sin embargo, la identificación de especies en estadios tempranos es usualmente una tarea complicada, debido a la falta de características morfológicas distintivas (Moser & Boehlert 1991; Hyde *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2007).

Estas limitaciones son evidentes para ciertos grupos taxonómicos, en ciertas regiones del mundo (Kendall *et al.*, 1984). En la costa Noreste del Pacífico, de un total de 627 especies de peces marinos registrados, se conoce aproximadamente el 7% de sus huevos y el 44% de sus larvas (Kendall & Matarese, 1994).

En el Golfo de California la identificación de larvas de peces más allá del nivel de familia en algunos especímenes es imposible por los métodos antes mencionados (Brogan, 1994). En un estudio de composición de larvas de peces en el Alto Golfo de California, Sánchez-Velasco *et al.* (2011), identificaron 43 de 102 taxa colectados, a nivel especie. Estas dificultades taxonómicas en la identificación de larvas de peces fueron debidas a que un gran número de larvas (más del 85%) se encontraba en estadio de preflexión.

La familia Sciaenidae, comúnmente conocida como corvinas o roncadore, se encuentra representada por aproximadamente 100 especies en el Pacífico Oriental Tropical y constituyen un componente económicamente redituable de las capturas de las pesquerías costeras. Las larvas de la familia Sciaenidae se caracterizan por presentar generalmente de 25 a 26 miómeros y ser relativamente grandes, la cabeza robusta y un poco bulbosa, estómago triangular e intestino en forma espiral y relativamente delgado. Presentan el tronco, el intestino y la cola delgados. Algunas con pigmentos en la cabeza, nuca, mandíbulas, estómago y en la línea media ventral post-anal (Moser, 1996).

En la región del Alto Golfo de California (AGC) se han registrado alrededor de 20 especies (Heiden, 1985) de las cuales, solo cinco de ellas presentan descripciones larvarias completas: *Atractoscion nobilis*, *Cheilotrema saturnum*,

Seriphus politus, *Umbrina roncadorensis* y *Menticirrhus undulatus* (Moser, 1996); y tres más cuentan con la descripción de larvas en estadio preflexión (*Cynoscion parvinnis*, *Cynoscion reticulatus* y *Totoaba macdonaldi*) (Ramírez-Sevilla et al., 1986; Díaz-Viloria et al., 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de Sciaenidae reportadas en el Alto Golfo y el Golfo de California.

Sciaenidae	Golfo de California	Alto Golfo de California	Descripción larvaria (completa)	Descripción (preflexión)
1 <i>Atractoscion nobilis</i>	X	X	X	
2 <i>Bairdiella armata</i>	X			
3 <i>Bairdiella incistia</i>	X	X		
4 <i>Cheilotrema saturnum</i>	X	X	X	
5 <i>Corvula macrops</i>	X			
6 <i>Cynoscion othonopterus</i>	X	X		
7 <i>Cynoscion parvipinnis</i>	X	X		X
8 <i>Cynoscion reticulatus</i>	X	X		X
9 <i>Cynoscion squamipinnis</i>	X	X		
10 <i>Cynoscion stolzmanni</i>	X			
11 <i>Cynoscion xanthulus</i>	X	X		
12 <i>Elattarchus archidium</i>	X			
13 <i>Isopisthus remifer</i>	X	X		
14 <i>Larimus acclivis</i>	X	X		
15 <i>Larimus argenteus</i>	X			
16 <i>Larimus effulgens</i>	X			
17 <i>Menticirrhus elongatus</i>	X			
18 <i>Menticirrhus nasus</i>	X	X		
19 <i>Menticirrhus panamensis</i>	X	X		
20 <i>Menticirrhus undulatus</i>	X	X	X	
21 <i>Micropogonias altipinnis</i>	X	X		
22 <i>Micropogonias ectenes</i>	X			
23 <i>Micropogonias megalops</i>	X	X		
24 <i>Odontoscion xanthops</i>	X			
25 <i>Ophioscion scierus</i>	X			
26 <i>Ophioscion strabo</i>	X			
27 <i>Roncadorensis stearnsii</i>	X			
28 <i>Seriphus politus</i>	X	X	X	
29 <i>Stellifer illecebrosus</i>	X			
30 <i>Totoaba macdonaldi</i>	X	X		X
32 <i>Umbrina roncadorensis</i>	X	X	X	
33 <i>Umbrina wintersteeni</i>	X			

Ante la falta de descripciones larvarias y la dificultad de identificar estadios larvarios tempranos, el análisis de ADN ha demostrado ser una herramienta eficaz en la identificación de varias especies de animales sin importar el estadio de desarrollo en el que se encuentre. Para esto recientemente se ha propuesto que la secuencia de un gen sencillo como es el citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI), es adecuada para la discriminación de una gran parte de las especies animales (Hebert *et al.*, 2003). Este concepto denominado código de barras de ADN ha sido probado exitosamente en una gran variedad de invertebrados, peces, aves, anfibios, reptiles y mamíferos. Las conclusiones de estos estudios, son que existe suficiente variación inter-específica para la identificación de especies (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005; Pegg *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2007; Lane, 2009).

En la actualidad la tecnología utilizada para la obtención de secuencias de ADN de larvas de peces, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se encuentra bien desarrollada (Teletchea, 2009) y la eficiencia en determinar la especie de un espécimen (larva) recae en aparear su secuencia con una secuencia obtenida de un espécimen juvenil o adulto correctamente identificado de la misma especie o de una secuencia reportada previamente (Dawnay *et al.*, 2007).

Proyectos como el de "código de barras" (BOLD) han generado iniciadores universales y bases de datos con secuencias de una amplia variedad de peces, que junto con otros bancos de datos (GenBank), han creado las bases para la identificación de especies de larvas de peces mediante herramientas moleculares.

Con base en lo anterior, este trabajo de tesis pretende identificar a nivel de especie los estadios larvarios de cuatro morfotipos de Sciaenidae encontrados en el Alto Golfo de California durante septiembre del 2012, mediante técnicas moleculares y morfológicas. Así como obtener las descripciones larvarias de las especies identificadas.

2. ANTECEDENTES

La mayoría de los estudios realizados en especies de la familia Sciaenidae se han enfocado en aspectos poblacionales, manejo, distribución y abundancias de las especies y pocos son los que se refieren a la taxonomía de sus estadios tempranos.

2.1. Identificación taxonómica de larvas de peces de Sciaenidae

En lo que se refiere a los diferentes estudios enfocados a la identificación de larvas de peces, Kendall & Matarese (1994) estiman que en el mundo se conoce alrededor del 4% de los huevos y el 10% de las larvas de las especies de peces marinos.

Los estudios que tratan sobre las primeras fases de vida de las especies de la familia Sciaenidae son escasos, hasta el momento se han reportado las descripciones larvianas completas de siete especies: *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860), *Cheilotrema saturnum* (Girard, 1858), *Genyonemus lineatus* (Ayres, 1881), *Menticirrhus undulatus* (Girard, 1854), *Roncador stearnsii* (Steindachner, 1875), *Seriphus politus* (Ayres, 1861) y *Umbrina roncadorensis* (Jordan y Gilbert, 1881), del Pacífico Oriental Tropical (Moser, 1996). Así como la descripción del huevo y larva en preflexión de *Cynoscion parvipinnis* (Ayres, 1861) (Ramírez-Sevilla *et al.*, 1986).

En la región del AGC, Sánchez-Velasco *et al.*, (2011), durante un estudio de identificación de larvas de peces en junio del 2008 reportaron dos especies de Sciaenidae: *Atractoscion nobilis* y *Cheilotrema saturnum* y 15 morfotipos que no pudieron identificar a nivel especie. De igual manera en la misma región Jiménez-Rosenberg *et al.*, (2012), durante junio de 2010 reportaron tres especies: *Cheilotrema saturnum*, *Seriphus politus* y *Umbrina roncadorensis*, y nueve morfotipos, incrementando uno nuevo a los reportados previamente por Sánchez-Velasco *et al.*, (2011).

2.2. Identificación genética de larvas de peces

La primera aplicación de una única secuencia de una fracción del gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI) con un enfoque de identificación de especies mediante el establecimiento de un código de barras de ADN, fue propuesta por Herbert *et al.* (2003). Lo que proporcionó un método de identificación que permite detallar la descripción de estadios tempranos de especies de peces, mediante la utilización de secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt).

En consecuencia los estudios de identificación de estadios tempranos de peces mediante marcadores moleculares se han ido incrementando. Hyde *et al.*, (2005) mediante la fracción citocromo *b* identificaron siete larvas de marlín rayado (*Tetrapturus audax*) en Hawaii. De igual manera Richardson *et al.* (2007) identificaron 89% de larvas de atunes y picudos de Florida. Valdez-Moreno *et al.* (2010) identificaron seis especies de huevos y 34 especies de larvas de 1,392 ejemplares de la Península de Yucatán, mediante la fracción COI.

En lo que respecta a trabajos que combinan el análisis genético y taxonómico se encuentran el de Vázquez-Yeomans *et al.* (2011) quienes identificaron y describieron una larva en postflexión del pez león *Pterois volitans*, especie invasora del Indo-pacífico en aguas de Yucatán, mediante el uso de la fracción COI del ADNmt. Por otra parte, Tawa *et al.* (2012) identificaron y describieron tres larvas leptocéfalas de *Scuticaria tigrina* en la costa de Japón, mediante análisis morfométrico y genético con la fracción 16S del ADNmt. De igual manera, Tawa *et al.* (2014) identificaron y describieron ocho larvas leptocéfalas de *Gymnothorax sagmacephalus* y *Gymnothorax albimarginatus*.

En lo que refiere al AGC, Díaz-Viloria *et al.* (2013) identificaron genéticamente dos morfotipos larvarios como *Cynoscion reticulatus* y *Totoaba macdonaldi*, utilizando la fracción 16S del ADNmt y se describieron morfológicamente las larvas en preflexión de estas dos especies. Sin embargo, según los registros mencionados anteriormente, aún quedan alrededor de 11 morfotipos de Sciaenidae por identificar en el AGC.

3. JUSTIFICACIÓN

El AGC es un área compleja donde se encuentran especies endémicas de la familia Sciaenidae, como son la *Totoaba macdonaldi* [especie en protección (NOM 059-SEMARNAT-2001)], *Cynoscion othonopterus* y *Micropogonias megalops* (Chao *et al.*, 1995). Algunas de estas, así como otras de la familia: *Cynoscion parvipinnis* y *Cynoscion reticulatus* son explotadas comercialmente (Araya 1982). Esto ha llevado a plantear estudios multidisciplinarios que permitan obtener información sobre los estadios de desarrollo de estas especies, en particular sobre las descripciones larvianas, para conocer sus áreas y épocas de desove y apoyar el manejo de las pesquerías en la región del AGC.

Con base en lo anterior, se requiere de la implementación del análisis genético, el cual permite la identificación al nivel específico de los estadios tempranos de morfotipos larvianos de peces, que no pueden ser identificados por la falta de descripciones morfológicas o escasas de características distintivas con valor taxonómico.

4. HIPÓTESIS

Partiendo de la premisa de que cada “morfotipo larvario” está constituido por aquellos organismos diferenciados por sus características fenotípicas como una unidad taxonómica o taxón independiente, se espera encontrar mediante análisis genéticos que cada uno de los morfotipos larvarios de Sciaenidae recolectados en el Alto Golfo de California, sean especies diferentes.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Identificar las larvas de peces de la familia Sciaenidae encontradas en el Alto Golfo de California en septiembre de 2012, mediante análisis morfológico y genético.

5.2. Objetivos particulares.

1. Determinar los morfotipos larvarios de Sciaenidae.
2. Estimar las divergencias genéticas intra e inter-específicas de las fracciones (COI y 16S) en las especies de Sciaenidae, colectadas en el Alto Golfo de California.
3. Delinear las relaciones entre las secuencias de larvas y de referencia de especies de Sciaenidae.
4. Describir morfológica, merística y morfométricamente a las larvas identificadas a nivel de especie mediante métodos moleculares.
5. Determinar la distribución (presencia/ausencia) de las larvas identificadas de Sciaenidae en el Alto Golfo de California.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California se localiza entre la península de California y los estados de Sonora y Sinaloa. Esta estrecha porción de mar se encuentra ubicado en la parte occidental de la República Mexicana, entre los 22° 50' y 31° 58' de latitud norte y de los 107° 20' a los 114° 45' de longitud oeste, midiendo aproximadamente 1000 km de largo por 150 km de ancho en promedio (Santana *et al.*, 2004). El Golfo de California mediante criterios oceanográficos y biogeográficos se divide en varias provincias como se observa en la Figura 1: (a) la zona de entrada, en comunicación abierta con el Océano Pacífico Oriental Tropical a través de una línea desde Cabo San Lucas a Cabo Corrientes (“la boca exterior”). (b) el sur del Golfo de California abarca desde Cabo San Lucas-Dorado (“en el interior de la boca”) hasta el sur de las grandes islas. (c) El archipiélago o zona de las grandes islas tiene varios canales estrechos y umbrales cuyas profundidades máximas se sitúan entre 300 y 600 m. (d) El Norte del Golfo de California (NGC) y (e) el Alto Golfo de California (AGC), con profundidades < 30 m (Lavín & Marinone, 2003).

La Reserva de la Biosfera del AGC y Delta del Río Colorado abarca un área de aproximadamente 5000 km². Está dividida en dos secciones: la zona núcleo y la zona de amortiguamiento (marcadas como C y B respectivamente en la Figura 2); la zona núcleo está delimitada por una línea imaginaria que se extiende desde El Golfo de Santa Clara en Sonora hasta el Estero La Ramada en Baja California. El propósito de esta zona es conservar el medio en su estado natural, previniendo el deterioro y restaurando las áreas impactadas. La zona de amortiguamiento está delimitada por la línea imaginaria del límite de la zona núcleo y otra línea que se extiende de San Felipe, Baja California hasta Puerto Peñasco, Sonora. En esta zona se busca un balance entre las actividades humanas y la naturaleza permitiendo algunas actividades de pesca comercial (Santana *et al.*, 2004).

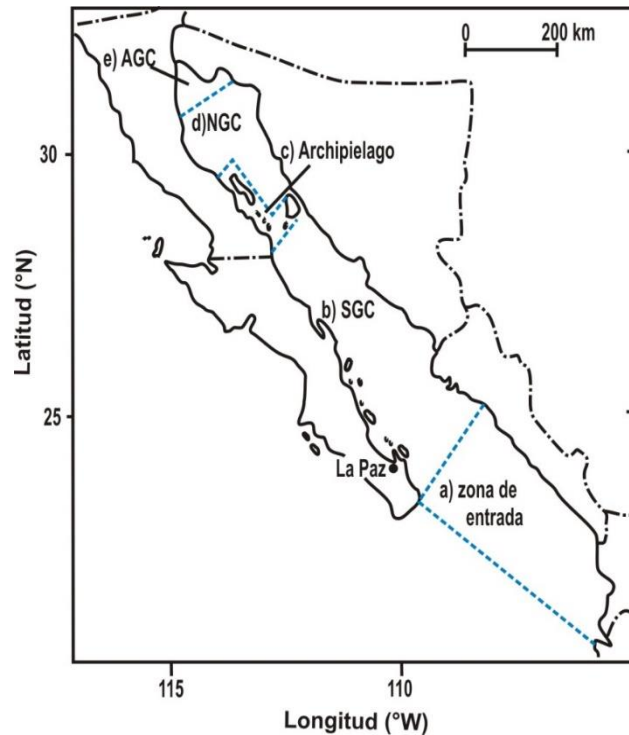


Figura 1. División del Golfo de California con base en sus características batimétricas y oceanográficas: a) Zona de entrada, b) Sur del Golfo de California (SGC), c) Archipiélago o zona de las grandes islas, d) Norte del Golfo de California (NGC), e) Alto Golfo de California (AGC). Mapa tomado y modificado de Lavín & Marinone (2003).

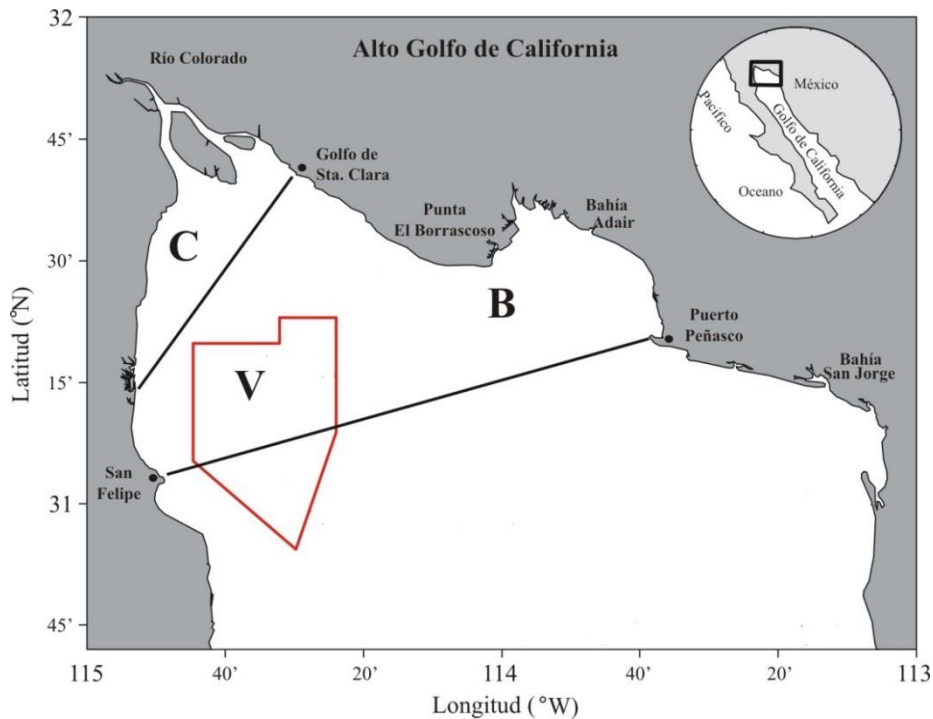


Figura 2. División del Alto Golfo de California: C) zona núcleo, B) zona de amortiguamiento y V) refugio de la vaquita marina, tomado y modificado de Sánchez Velasco *et al.* (2012).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Muestreos

Las larvas empleadas en el presente trabajo se obtuvieron de un crucero de investigación denominado PANGAS1209, realizado a bordo del B/O Francisco de Ulloa del 3 al 10 de septiembre del 2012 en el cual se recolectaron 72 muestras de zooplancton en el AGC (Fig. 3). Estas muestras fueron recolectadas con una red cónica (diámetro de boca de 60 cm, 3 m de largo y malla de 505 μ m), en el estrato superficial (0-10 m de profundidad), siguiendo la metodología estándar de Smith & Richardson (1977). Las muestras completas de zooplancton fueron preservadas en etanol al 80%.

Adicionalmente se analizaron muestras de larvas de la familia Sciaenidae del crucero oceanográfico PANGAS1306, realizado en esta misma región en junio de 2013, con la finalidad de incluir algunos estadios larvarios no encontrados en los morfotipos del crucero PANGAS1209.

Se obtuvieron especímenes adultos de la familia Sciaenidae: *Cynoscion reticulatus* ($n = 7$), *Isopisthus remifer* ($n = 4$), *Umbrina wintersteeni* ($n = 5$), *Menticirrhus nasus* ($n = 1$) y *Umbrina roncadorensis* ($n = 1$) a través de la pesca comercial en los puertos de San Felipe, Baja California en septiembre 2012 y en el Golfo de Santa Clara y Puerto Peñasco, Sonora en septiembre del 2013 (Fig. 3). A cada espécimen se le tomó una muestra de tejido (músculo), misma que se preservó en etanol al 80%. Todos los especímenes adultos recolectados fueron congelados hasta su identificación taxonómica. También se emplearon secuencias del GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (No. de Acceso), de la fracción COI y 16S de 10 especies, pertenecientes a *Totoaba macdonaldi* (KC208684, KC208659), *Atractoscione nobilis* (GU440241, JQ740934), *Cynoscion othonopterus* (KC208685, KC208662), *Cynoscion parvipinnis* (GU440301, DQ090067), *Cynoscion reticulatus* (KC208678, KC208653), *Cheilotrema saturnum* (GU440274), *Menticirrhus elongatus* (GU440404, KC208664), *Micropogonias megalops* (KC208690, KC208669), *Roncadorensis stearnsii* (GU440506) y *Umbrina roncadorensis* (GU440563).

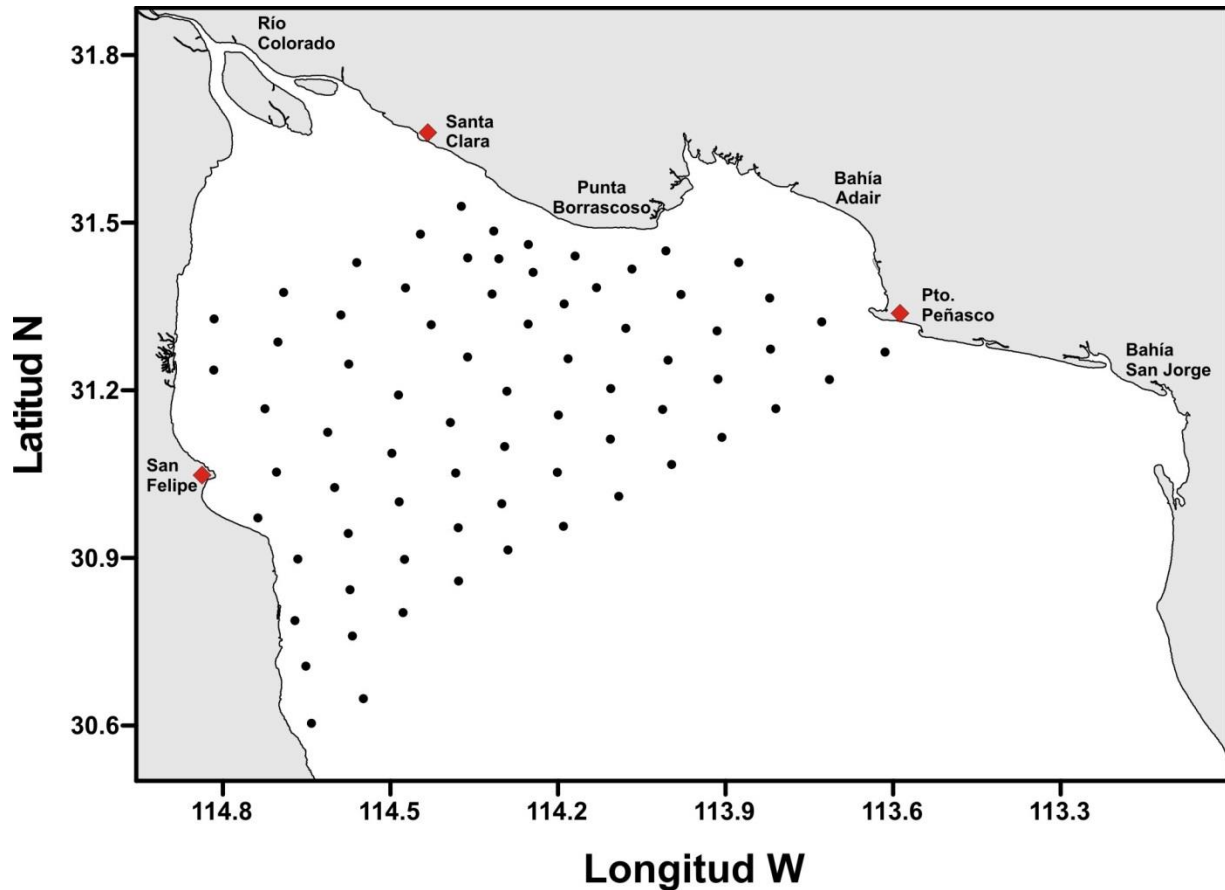


Figura 3. Red de estaciones de plancton (puntos negros) y sitios de recolecta de especímenes adultos (rombos rojos) en el Alto Golfo de California.

7.2. Identificación de larvas de peces y especímenes adultos

En el laboratorio zooplancton del Departamento de Plancton y Ecología Marina del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) se separaron las larvas de peces de las muestras del zooplancton y se identificaron a nivel de familia (Moser 1996). También se determinaron sus estadios de desarrollo, usando el esquema más general dividido en tres etapas o estadios (preflexión, flexión y postflexión). Este esquema se basa en el grado de flexión de la sección terminal de la notocorda durante la formación de la aleta caudal. La etapa preflexión inicia a partir de la completa absorción de las reservas endógenas y termina hasta antes del inicio de la flexión de la notocorda. La etapa flexión inicia a partir de la flexión de la notocorda y termina hasta la completa formación de la placa hipúrica. La etapa postflexión inicia al estar completamente formada la placa hipúrica y termina con la

completa formación de los elementos de las aletas pares e impares (Kendall *et al.*, 1984).

Los morfotipos larvarios de Sciaenidae se separaron de acuerdo al criterio: de que cada uno de los morfotipos estuvo constituido por aquellos organismos diferenciados por sus características (principalmente la pigmentación), como una unidad taxonómica independiente (Ordóñez-Guillén, 2014).

Los especímenes adultos se identificaron a nivel de especie con la ayuda de la guías de identificación propuestas por la FAO para el Pacífico Centro Oriental (Chao, 1995). Posteriormente se tomaron fotografías digitales y se depositaron dos especímenes en la colección ictiológica del CICIMAR-IPN con los números de resguardo 8320 para *Isopisthus remifer* y 8321 *Menticirrhus nasus*.

7.3. Análisis genético

7.3.1. Extracción de ADN

Adultos

Se extrajo ADN de los adultos usando la técnica de precipitación de sales (Lopera-Barrero *et al.*, 2008), descrita a continuación. Se puso a digerir una pequeña porción de tejido (músculo) en 400 μ L de buffer de lisis (5M NaCl, 1M Tris pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS) y 20 μ L de proteinasa-K (20 mg/mL) a 55 °C en un horno de hibridación (PROBIOT, Labnet) durante 24 horas. Posteriormente se agregaron 200 μ L de NaCl saturado (~6M) y se agitó vigorosamente, se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante (600 μ L) a un tubo con 1mL de etanol absoluto a -20°C, se invirtió para precipitar el ADN hasta que este fuera visible y se centrifugó nuevamente. Se volvió a lavar con 1mL de etanol al (70%) y se centrifugó a 13,000 rpm por cinco minutos, se decantó el alcohol y se dejó evaporar cualquier traza de alcohol hasta que el pellet de ADN se pusiera transparente. Finalmente el ADN obtenido se suspendió en 100 μ L de TE. Para verificar la extracción de ADN, se realizó electroforesis en geles de agarosa (1%), a 80 Voltios durante 30-60 min. Posteriormente los geles se tiñeron con SybrGold™ (1X) durante 15-20 min y se visualizaron con un foto-documentador

(UVP BioDoc-it™ Imaging System). La concentración de ADN de los peces adultos se estandarizó a 50–100 ng/μL.

Larvas

Mediante la técnica de Selvamani *et al.* (2001) se extrajo el ADN de cinco larvas de cada morfotipo larvario en cada estadio. Una pequeña porción de tejido (0.5 x 1 mm) o un ojo de cada una de las larvas, se incubó en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, Tween-20 0.05%) y 5μL de proteinasa-K (4 mg/mL) en horno de hibridación (PROBIOT Hibridation Oven, Labnet) durante 24h a 55 °C. Posteriormente, la mezcla homogénea se incubó a 95 °C por 10 min para detener la acción de la proteinasa-K y se almacenó a -20 °C hasta su amplificación vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en ingles).

Cabe mencionar que esta técnica solo se usó en las primeras extracciones, debido a que los resultados de algunas extracciones no fueron de buena calidad para la PCR. Se decidió cambiar a la técnica de Hyde *et al.* (2005), en donde se utilizó la larva completa (cortada en pedacitos) en tubos esterilizados de 0.2 mL con 150 μL de Chelex 100 (10%) y 5μL de Proteinasa-K (4 mg/mL). Se incubó a 60 °C por 20 min, después se calentó a 103 °C por 25 min para detener la acción de la proteinasa-K y se almacenó a -20 °C previo a la PCR. Los extractos de ADN de larvas no se corrieron en geles de agarosa al 1%, debido a que fueron concentraciones muy bajas de ADN. De los extractos de larvas, solo se utilizó el sobrenadante (que contiene el ADN genómico) para la PCR.

7.3.2. Amplificación (PCR).

Se amplificaron las fracciones del citocromo c oxidasa subunidad I (COI) y 16S ARNr (16S) del ADN mitocondrial (ADNmt), empleándose los siguientes iniciadores (Tabla 2).

Tabla 2. Juegos de iniciadores propuestos para la amplificación de COI y 16S.

Fracción	Nombre	Secuencia del iniciador (5'-3')	T.a. (°C)	Referencia
COI	FishF1	TTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG	50	Ivanova <i>et al.</i> (2007) Ward <i>et al.</i> (2005)
	FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA		
16S	16Sa	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	53	Palumbi (1996)
	16Sb	CCGGTTTGAACCTCAGATCACGT		

T.a.; Temperatura de acoplamiento

Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 25 μL : conteniendo 2 μL de ADN (50 ng/mL), con 0.48 μM de cada iniciador, 0.2 μM de cada dNTP, 0.41 μL de BSA, 0.025 unidades de *Taq* polimerasa (Invitrogen), solución amortiguadora para *Taq* 1X (Invitrogen) y 2.1 mM de MgCl_2 . Las condiciones termales de PCR (Progene Thermal Cycle, Techne) fueron: 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de acoplamiento (Tabla 2) por 1 min y 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 4 min.

Los productos de PCR de adultos y larvas se analizaron mediante electroforesis de geles de agarosa (1%) durante 30-60 min a 80 Voltios. Los geles se tiñeron con SybrGold™ (1X) durante 15-20 min y se visualizaron con un fotodocumentador (UVP BioDoc-it™ Imaging System).

Se midió la concentración y calidad de los productos de PCR mediante un Nanodrop (NANODROP 2000, Thermo Scientific) con lecturas de densidad óptica en longitudes de onda 260 y 280 nm. Los productos de PCR de adultos y larvas con una concentración igual o mayor a 100 ng/ μL y lecturas > 1.7 de la proporción 260/280 nm se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Macrogen (Corea) en un secuenciador automático ABI Prism 3730XL.

7.3.3. Análisis de secuencias

Las secuencias de cada individuo fueron alineadas y verificadas con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2007). Se obtuvo una secuencia de cada individuo por la conciliación de las secuencias de las dos hebras de ADN secuenciadas de manera independiente. Una vez obtenidas las secuencias de cada individuo, estas se alinearon usando Clustal W (MEGA5), vers. 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). Las secuencias resultantes serán depositadas en GenBank.

Con las secuencias obtenidas de cada uno de los morfotipos se realizó un análisis de homologías con las secuencias de la base de datos de GenBank y con la ayuda del programa BLAST^(R) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para descartar que fueran especies de otras familias. Se obtuvieron las distancias genéticas de acuerdo con el modelo parámetro-dos de Kimura (Kimura, 1980), entre las secuencias generadas y las

obtenidas de GenBank y BOLD (Barcode of Life Data system), con la ayuda del programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2007).

Antes de construir arboles con el método del Vecino más Cercano (Neighbor-Joining), se determinó si los datos eran adecuados para la estimación de árboles del Vecino más Cercano (NJ) (Nei & Kumar, 2000), con MEGA5 (Tamura *et al.*, 2007). Si el valor de la distancia promedio de Jukes-Cantor (d) fue menor a uno, los datos eran adecuados.

Se construyeron los arboles NJ con las secuencias obtenidas de las fracciones 16S y COI de las especies de adultos y larvas de peces, con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2007). Para probar la topología de los árboles se corrieron 5000 réplicas con el método de re-muestreo (bootstrap).

7.4. Caracterización de las larvas de las especies identificadas genéticamente.

Para la observación de las características se empleó un microscopio estereoscópico marca ZEISS, con aumento de 0.65x a 5.00x. Se utilizaron 30 larvas para realizar la descripción de los estadios larvarios de cada morfotipo, para esto se consideraron las siguientes características:

1) Merísticas: se tomaron en cuenta el número de miómeros (pre-anales, post-anales y totales) y los elementos de las aletas (Anal, Dorsal, Pectoral, Pélvica y Caudal).

2) Morfométricas: se utilizaron las longitudes del cuerpo (Cefálica, Altura, Hocico-Ano, Postanal, Longitud Notocordal), así como las longitudes cefálicas (Diámetro del ojo, Hocico) (Fig. 4).

3) Patrones de pigmentación: se consideraron el número y la ubicación de los pigmentos en las diferentes partes del cuerpo de la larva (Dorsales, Cefálicos, Preanales, Postanales) (Fig. 5).

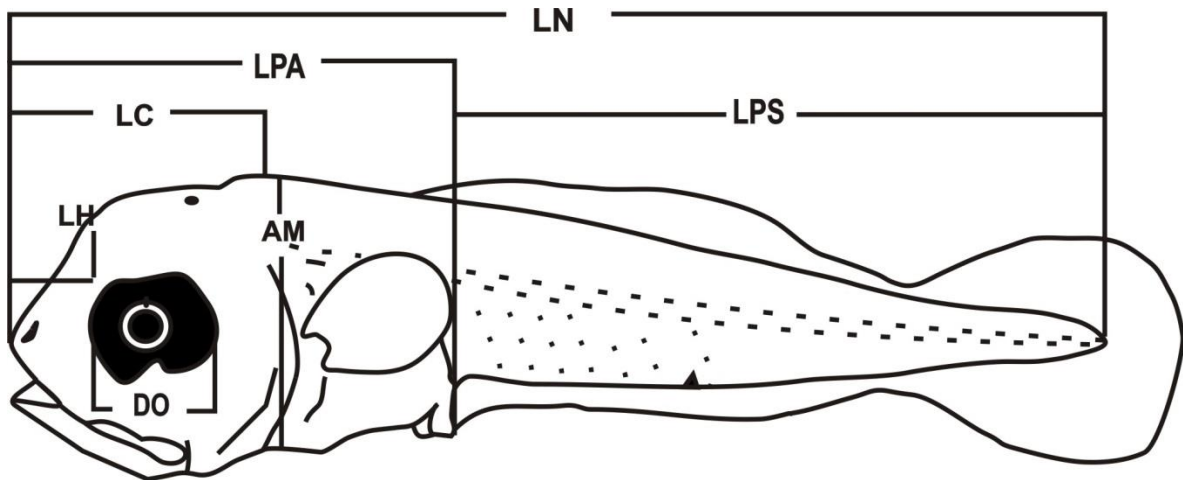


Figura 4. Diagrama conceptual de larva de pez con las características morfométricas medidas a cada una de las larvas, Longitud Notocordal (LN), Longitud Hocico-Ano (LPA), Longitud Postanal (LPS), Longitud Cefálica (LC), Longitud Hocico (LH), Diámetro del Ojo (DO) y Altura del cuerpo (AM). Imagen tomada y modificada de Jiménez-Rosenberg (1998).

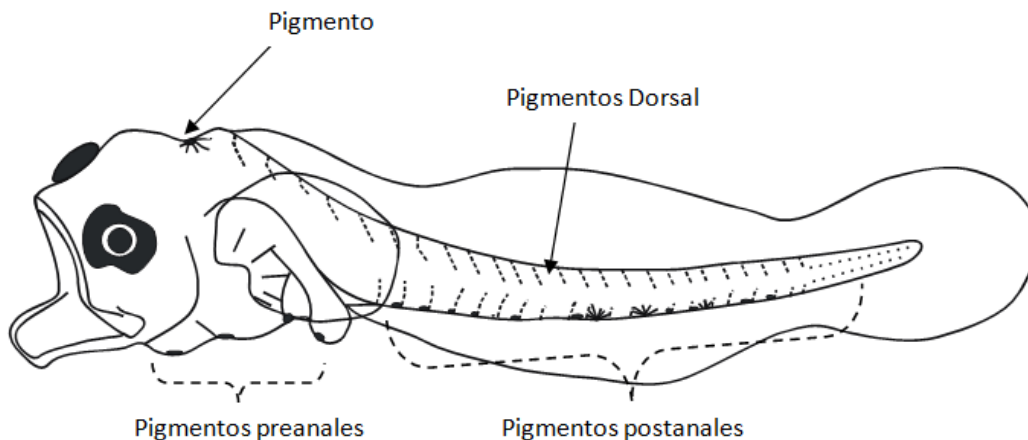


Figura 5. Esquema conceptual de larva de pez con los patrones de pigmentación considerados en cada una de las larvas.

Los datos de morfometría se detallan a continuación (Fig. 4). La Longitud estándar o Longitud notocordal (LN), en estadio de preflexión se tomó de la punta del hocico a la punta del notocordio. En estadio de flexión la medida se tomó de la punta del hocico hasta una línea vertical perpendicular a la punta del notocordio, cuando

los huesos hipurales excedieron esta línea la medición se realizó de la punta del hocico hasta el extremo posterior de la placa hipúrica.

La Altura del cuerpo (AM) se midió en la parte más alta de la larva en una línea vertical entre el margen dorsal y el ventral. La Longitud hocico-ano o preanal (LPA), fue la distancia entre la punta del hocico al ano. La longitud Postanal (LPS) se midió de la terminación del ano hasta la punta del notocordio. La Longitud Cefálica (LC), fue la distancia de la punta del hocico al borde posterior de la cápsula ótica. La Longitud del Hocico (LH), fue medida de la punta del hocico al margen anterior de la órbita ocular. El Diámetro Ocular (DO), se obtuvo midiendo la distancia horizontal entre los márgenes de la órbita del ojo (Jiménez-Rosenberg, 1998).

Para determinar si las proporciones de medidas corporales tomadas en larvas en estadio de preflexión (registrado en todos los morfotipos larvarios) permitían la diferenciación entre los morfotipos se realizó un análisis discriminante usando el programa Statistica v. 8, con las características completas y depuradas. Donde las características utilizadas fueron: la longitud cefálica en relación a la longitud notocordal (LC/LN), la altura del cuerpo en relación a la longitud notocordal (AM/LN), la longitud preanal en relación a la longitud notocordal (LPA/LN), la longitud postanal en relación a la longitud notocordal (LPS/LN), así como el diámetro del ojo en relación a la longitud cefálica (DO/LC) y la longitud del hocico en relación a la longitud cefálica (LH/LC).

Una vez identificadas la especie de cada uno de los morfotipos, se elaboraron mapas de distribución (presencia - ausencia) con el programa Surfer^(R) 10 para cada especie. A la par se contabilizó el número de larvas registradas de cada una de las especies.

8. RESULTADOS

8.1. Identificación morfológica

Se recolectaron 571 larvas de la familia Sciaenidae en 32 de las 72 estaciones muestreadas en el AGC, todas las larvas se ubicaron taxonómicamente, de acuerdo a su pigmentación en cuatro morfotipos (Fig. 6).

Las características descriptivas para el morfotipo 1 fueron: la presencia de seis a ocho pigmentos pareados sobre la línea media ventral del estómago, sobre el pliegue anal, así como la presencia de uno o dos pigmentos dorsales sobre los miómeros 15 y 17. El morfotipo 2, se caracterizó por presentar más de 20 pigmentos en la línea media postanal, con dos pigmentos estrellados entre los miómeros 16 y 18, así como dos pigmentos estrellados en los primeros dos primeros miómeros dorsales. El morfotipo 3 presentó tres pigmentos en línea recta sobre la línea media preanal, 15 pigmentos postanales, dos de ellos estrellados entre los miómeros 15 y 17, así como uno o dos pigmentos sobre la nuca. El morfotipo 4 se caracterizó por presentar pigmentos dispersos sobre la mayor parte del cuerpo, además de presentar una línea pigmentada en la parte media lateral de la notocorda (Fig. 6).

Con material biológico recolectado durante el crucero PANGAS1306, se incrementó desarrollo larvario del morfotipo 1 en estadio de postflexión ($n = 5$), del morfotipo 2 en estadio de flexión ($n = 5$) y del morfotipo 4 en estadio de postflexión ($n = 4$). Las larvas de este crucero identificadas genéticamente únicamente fueron utilizadas para incrementar los estadios de desarrollo de los morfotipos encontrados en el crucero PANGAS1209, solo se tomaron en cuenta para las descripciones de estadios de desarrollo adicionales.

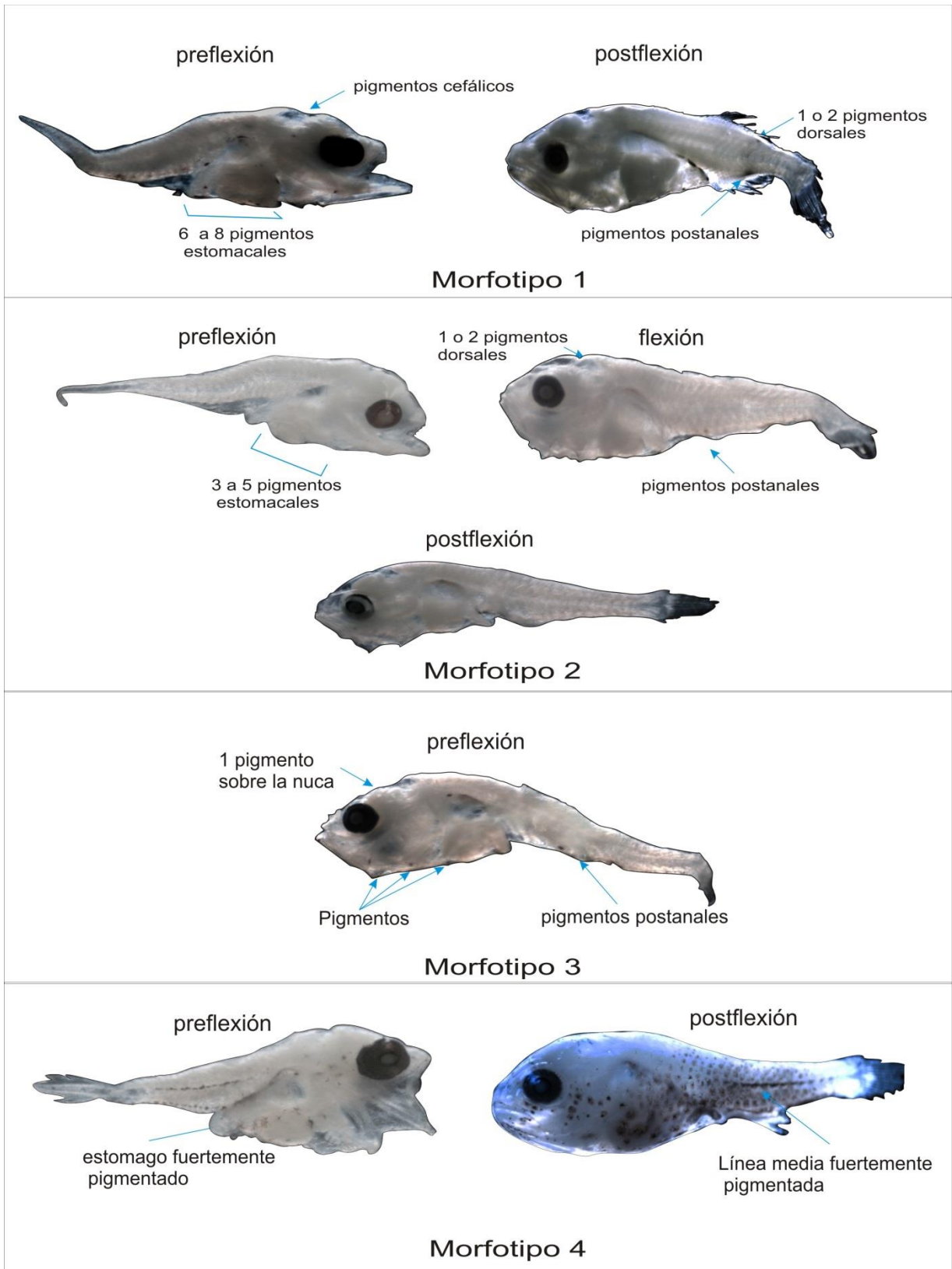


Figura 6. Fotos de morfotipos larvarios de la familia Sciaenidae, colectados en el AGC.

8.2. Análisis genético

En lo que se refiere al análisis de homologías de las secuencias obtenidas con las de la base de datos de NCBI, se observó que todas las secuencias de larvas fueron asignadas con secuencias de la Familia Sciaenidae con ambas fracciones (16S y COI). El morfotipo 1 en ambas fracciones se asignó con las especies *Cynoscion othonopterus* (KC208685, KC208662), *Cynoscion nothus* (JQ841864, AY857950) y *Cynoscion reticulatus* (KC2086731, KC208695) con los porcentajes de identidad del 100%, 95% y 94%, respectivamente. El morfotipo 2 en flexión y postflexión y el morfotipo 3 se asignaron a las secuencias de *Micropogonias megalops* (KC208689, KC208643) y *Bairdiella chrysoura* (GU225144) con los porcentajes de identidad del 100% y 99% respectivamente para la fracción COI, y *Micropogonias undulatus* (FJ175392) y *Sciaenops ocellatus* (JQ286004), con los porcentajes de identidad del 99% y 96% para 16S. El morfotipo 2 en preflexión se asignó con *Cynoscion reticulatus* (KC208673), *Cynoscion nothus* (JQ841863) y *Cynoscion othonopterus* (KC208685), con porcentajes de identidad de 100%, 94% y 94% en la fracción COI. El morfotipo 4 se asignó con *Menticirrhus elongatus* (KC208687), *Menticirrhus saxatilis* (KC015658), con los porcentajes de identidad del 86% y 86% respectivamente para la fracción COI y *Sciaenops ocellatus* (HQ731437) y *Totoaba macdonaldi* (KC208658), con porcentajes de identidad de 95% para ambas especies para 16S.

El porcentaje promedio de divergencia genética entre secuencias de COI, 486 pares de bases (pb), del mismo tipo larvario fue menor al 1%. Para la región 16S (482 pb) no se registró divergencia entre secuencias del mismo tipo larvario, lo que indicó la baja divergencia genética entre individuos del mismo tipo (Tabla. 3).

En lo que se refiere a las divergencias genéticas entre morfotipos, para la fracción COI se observó que el morfotipo 1 presentó divergencias genéticas promedio de 6.3, 14.4, 14.4 y 20.7% (Tabla 3), con una máxima de 20.4% y una mínima de 6.3%, al compararse con los demás morfotipos. En la fracción 16S se observaron los mismos resultados que en la fracción COI, con la observación de que la fracción 16S presentó menores divergencias genéticas. Con 16S se observó que el morfotipo 1 presentó divergencias genéticas promedio mayores al 4.7%, máximas

de 6.0% y mínimas de 4.6% (Tabla 3) al compararse con los demás morfotipos, indicando que el morfotipo 1 es una especie distinta a los demás morfotipos.

Con la fracción COI, se observó que los distintos estadios de desarrollo (preflexión, flexión y postflexión) del tipo 2 presentaron una divergencia genética promedio de 11.2%, máxima de 11.5% y mínima de 10.7% (Tabla 3), indicando que estos corresponden a dos especies diferentes. Sin embargo, al comparar el morfotipo 2 en flexión y postflexión contra el morfotipo 3 se observó una divergencia genética promedio de 0.6%, indicando que muy probablemente corresponden a la misma especie. Cabe señalar que las secuencias del 16S del morfotipo 2 en preflexión no se incluyeron en el análisis, debido a que no fueron de buena calidad. El morfotipo 2 en postflexión en 16S no registró divergencia genética con el morfotipo 3, indicando que ambos son de la misma especie, como se mencionó previamente con COI.

Al comparar las secuencias de COI del morfotipo 3 con las de los morfotipos 1, 2 (preflexión) y 4 se observaron divergencias genéticas promedio de 14.4, 11.2 y 22.7%, respectivamente, lo que indicó que son especies distintas. De igual manera, el morfotipo 4 presentó divergencias genéticas promedio mayores al 20.6% con el resto de los morfotipos, indicando que es una especie distinta de las antes mencionadas. En la fracción 16S el morfotipo 3 presentó divergencias genéticas promedio mayores al 4.7% con los morfotipos 1 y 4. De igual manera el morfotipo 4 presentó divergencias genéticas promedio mayores al 6% con los demás morfotipos, indicando que es una especie distinta de las tres antes mencionadas (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes promedios de divergencias genéticas de las fracciones COI (debajo de la diagonal) y 16S (arriba de la diagonal), entre los morfotipos larvarios encontrados en el AGC.

Divergencias promedios en (%)		16S				
COI	Morfotipos	1	2 (pref.)	2 (flex-post)	3	4
	1	0.06	-----	4.66	4.66	5.98
	2 (pref.)	6.32	0.00	-----	-----	-----
	2 (flex-post)	14.40	11.24	0.54	0.00	7.66
	3	14.37	11.19	0.57	0.58	7.66
	4	20.43	20.59	22.57	22.68	0.00
						0.12

Las divergencias genéticas en COI, entre las secuencias de los morfotipos y las secuencias de los adultos de Sciaenidae, mostraron que el morfotipo 1 presentó una divergencia genética promedio de 0.04% con las secuencias de *Cynoscion othonopterus*, lo que indicó que pertenece a esta especie. El morfotipo 2 en estadio de flexión y postflexión presentó una divergencia genética promedio de 0.3%, con las secuencias de *Micropogonias megalops*, mientras que en estadio de preflexión no presentó divergencia genética con las secuencias de *Cynoscion reticulatus*, indicando la presencia de dos especies en este morfotipo. Los morfotipos 3 y 4 presentaron divergencias genéticas promedio de 0.5% y 0.2% con las secuencias de *Micropogonias megalops* y *Menticirrhus nasus*, respectivamente, indicando sus especies. Cabe mencionar que cada uno de los morfotipos larvarios presentó divergencias mayores al 6% en comparación al resto de las especies de Sciaenidae (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de divergencia genética inter-específica de la fracción COI, entre las secuencias de los morfotipos larvarios encontrados en el AGC y secuencias de especies (adultos) recolectadas en la zona.

	Mínimo	Máximo	Promedio
Morfotipo 1 vs <i>Cynoscion othonopterus</i>	0	0.21	0.04
Morfotipo 1 vs Sciaenidae	6.4	21.3	15.1
Morfotipo 2 (preflexión) vs <i>Cynoscion reticulatus</i>	0	0	0
Morfotipo 2 (preflexión) vs Sciaenidae	6.4	20.7	14.2
Morfotipo 2 (flexión y postflexión) vs <i>Micropogonias megalops</i>	0	0.8	0.3
Morfotipo 2 (flexión y postflexión) vs Sciaenidae	10.7	21.3	16.2
Morfotipo 3 vs <i>Micropogonias megalops</i>	0	1.5	0.5
Morfotipo 3 vs Sciaenidae	10.7	23.1	16.2
Morfotipo 4 vs <i>Menticirrhus nasus</i>	0	0.2	0.06
Morfotipo 4 vs Sciaenidae	15.3	23.1	20.1

Las divergencias genéticas inter-específicas para la fracción 16S, entre las secuencias de los morfotipos larvarios y las secuencias de los adultos de Sciaenidae, mostraron los mismos resultados que COI. El morfotipo 1, no presentó divergencia genética con las secuencias de *Cynoscion othonopterus*. El morfotipo 2 (en flexión y postflexión) y el morfotipo 3 presentaron divergencias genéticas máximas de 0.3% y con un promedio no mayor a 0.05% con *Micropogonias megalops*. El morfotipo 4 no presentó divergencia genética con las secuencias de *Menticirrhus nasus* (Tabla 5).

Al igual que con COI, cada uno de los morfotipos larvarios presentaron divergencias genéticas altas al compararlos con el resto de las especies de Sciaenidae, (entre 4.3% y 9.6%), con excepción de *C. othonopterus* y *C. reticulatus* quienes mostraron divergencias genéticas de 1.3% (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de divergencia genética inter-específica de la fracción 16S, entre las secuencias de los morfotipos larvarios encontrados en el AGC y secuencias de especies (adultos) recolectadas en la zona.

	Mínimo	Máximo	Promedio
Morfotipo 1 vs <i>Cynoscion othonopterus</i>	0	0	0
Morfotipo 1 vs Sciaenidae	1.3	9.6	4.8
Morfotipo 2 (flexión y postflexión) vs <i>Micropogonias megalops</i>	0	0	0
Morfotipo 2 (flexión y postflexión) vs Sciaenidae	4.3	8.5	5.6
Morfotipo 3 vs <i>Micropogonias megalops</i>	0	0.3	0.05
Morfotipo 3 vs Sciaenidae	4.3	8.5	5.6
Morfotipo 4 vs <i>Menticirrhus nasus</i>	0	0	0
Morfotipo 4 vs Sciaenidae	6.04	9.6	6.7

En lo referente a la topología de los árboles del Vecino más Cercano (NJ), construidos con las fracciones COI y 16S (Figs. 7 y 8), se observó que el morfotipo 1 se agrupó con la especie *Cynoscion othonopterus* con un soporte de re-muestreo del 100% para la fracción COI, y con un soporte de re-muestreo del 88% para la fracción 16S. El morfotipo 2 (en preflexión), se agrupó con *Cynoscion reticulatus* con un soporte de re-muestreo del 100% en la fracción COI, en la fracción 16S no se registró este estadio. El morfotipo 2 (en flexión y postflexión) y el morfotipo 3 (en preflexión), se agruparon con *Micropogonias megalops* con soportes de re-muestreo del 100% para COI y 99% para 16S. El morfotipo 4, se agrupó con *Menticirrhus nasus* con un soporte de re-muestreo del 100% en la fracción COI y con un soporte del 99% en 16S. Estos resultados concuerdan con los resultados de divergencias genéticas antes mencionados y dan soporte estadístico a la identidad de los morfotipos larvarios a nivel de especie.

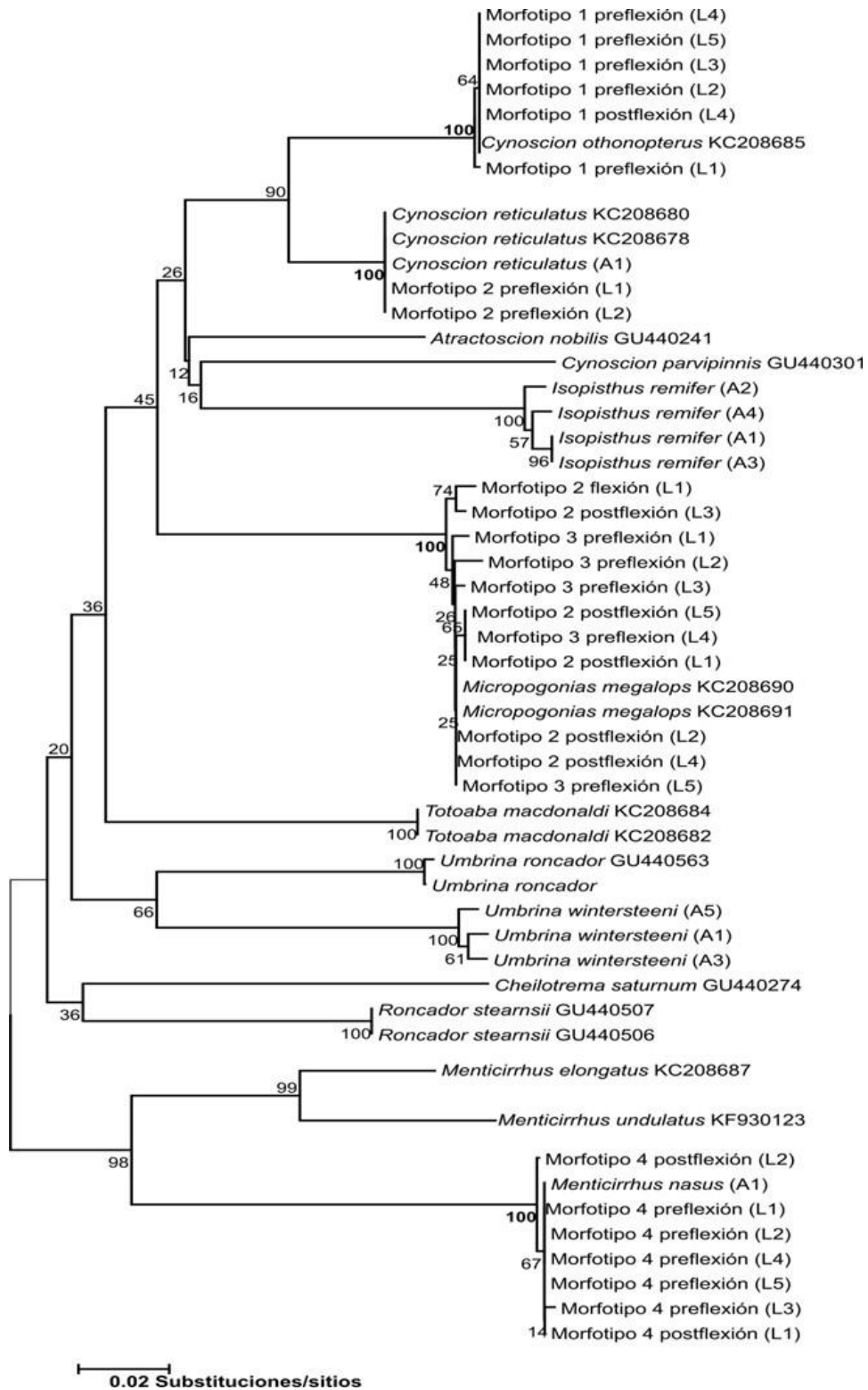


Figura 7. Árbol NJ basado en la fracción COI (486 pb), los valores de las ramas indican el soporte de las agrupaciones después de 5000 réplicas de re-muestreo. L = larva, A = Adulto.

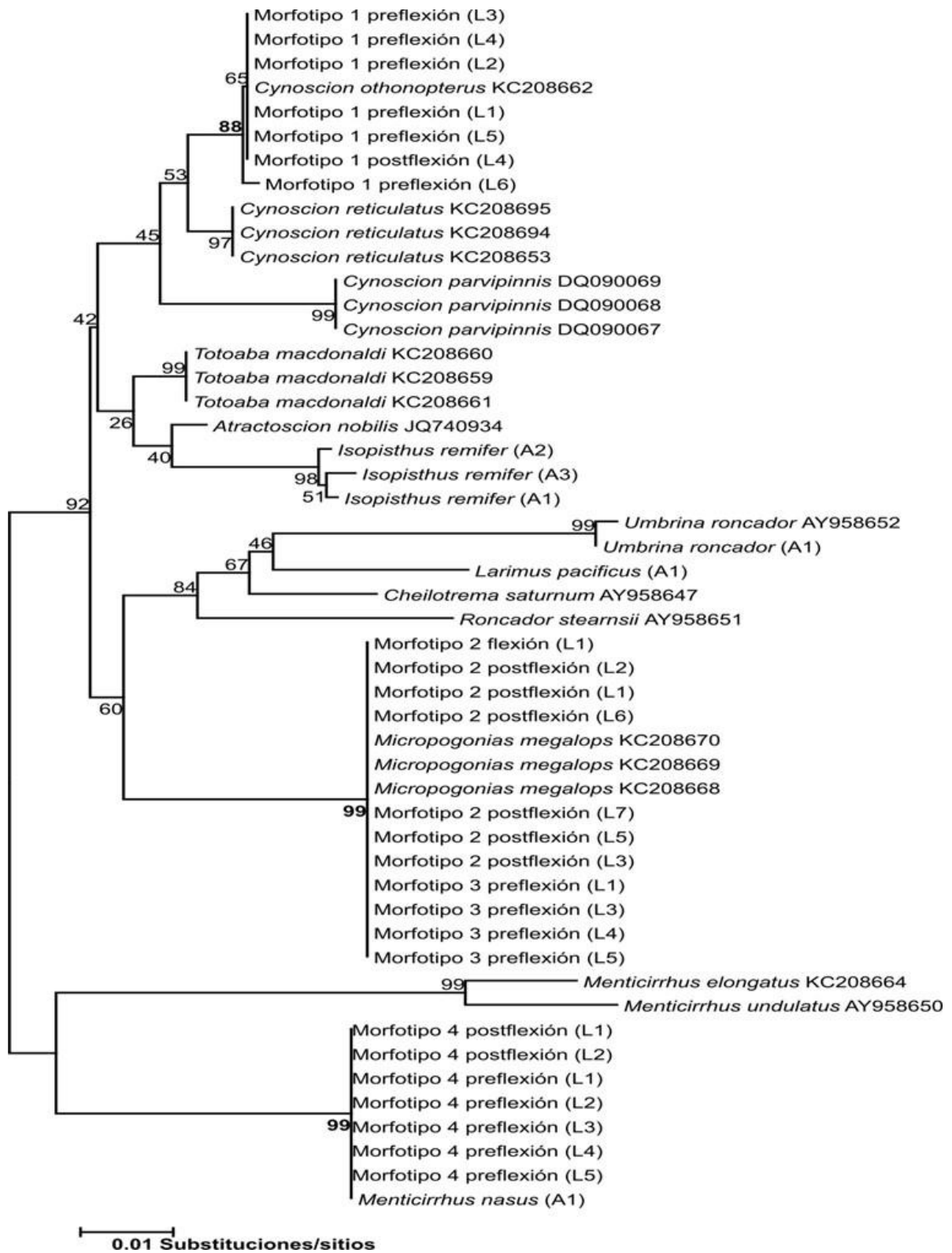


Figura 8. Árbol NJ basado en la fracción 16S (482 pb), los valores de las ramas indican el soporte de las agrupaciones después de 5000 réplicas de re-muestreo. L = larva, A = Adulto.

Síntesis del análisis genético.

Antes de realizar las descripciones de larvas de cada una de las especies hay que recordar que mediante el análisis genético se identificaron todos los morfotipos, en diferentes estadios, encontrados en el AGC durante septiembre 2012. Como se mencionó cada uno de los morfotipos se agrupó con una especie dada de Sciaenidae con soportes de re-muestreo mayores al 88% (Tabla.6). Solo un morfotipo (morfotipo 2) en diferentes estadios se agrupó con dos especies distintas, donde dos estadios (flexión y postflexión) se agruparon con la especie asignada al morfotipo 3. Con base a la identificación genética el número de larvas de cada morfotipo fue asignado a su especie correspondiente.

Tabla 6. Asignación de especies a cada uno de los morfotipos (mediante análisis genético).

Morfotipos	Especie	Soporte de re-muestreo (%)	
		COI	16S
1	<i>Cynoscion othonopterus</i>	100	88
2 (preflexión)	<i>Cynoscion reticulatus</i>	100	---
2 (flexión y postflexión)	<i>Micropogonias megalops</i>	100	99
3	<i>Micropogonias megalops</i>	100	99
4	<i>Menticirrhus nasus</i>	100	99

8.3. Descripción de larvas de la familia Sciaenidae

Las larvas encontradas presentaron una longitud notocordal (LN) de 1.23 mm hasta los 7 mm. De las cuales el 60% se encontraron en estadio de preflexión, el 34% en estadio de postflexión y el 6% en flexión.

8.3.1. Análisis morfométrico.

Se analizaron 246 larvas, de las cuales 108 larvas pertenecen a *Micropogonias megalops*, 24 a *Cynoscion othonopterus*, 47 a *Cynoscion reticulatus* y 67 a *Menticirrhus nasus*. En la Tabla 7 se detallan las etapas de desarrollo de cada una de las especies identificadas en el estudio así como sus intervalos de tallas.

Tabla 7. Intervalos de tallas (en milímetros) de las etapas larvarias de las especies identificadas.

	Preflexión	Flexión	Postflexión
<i>Micropogonias megalops</i>	1.8-2.6	2.7-3.9	4.0-6.9
<i>Cynoscion othonopterus</i>	1.5-3.4	-----	4.1-5.0
<i>Cynoscion reticulatus</i>	1.3-3.3	-----	-----
<i>Menticirrhus nasus</i>	1.4-3.4	-----	6.2-6.9

El análisis discriminante indicó que las proporciones corporales (LC/LN, AM/LN, LPA/LN, LPS/LN, DO/LC y H/LC) se sobreponen en la mayoría de las larvas de las cuatro especies en estadio de preflexión, mostrando en la raíz 1 (eje x) el 76.5% de la varianza y la raíz 2 (eje y) con el 14.6% (Fig. 9), con una $F=5.8$, una Lambda de Wilks de 0.5036 y una matriz de clasificación de 62.7% (Tabla.8).

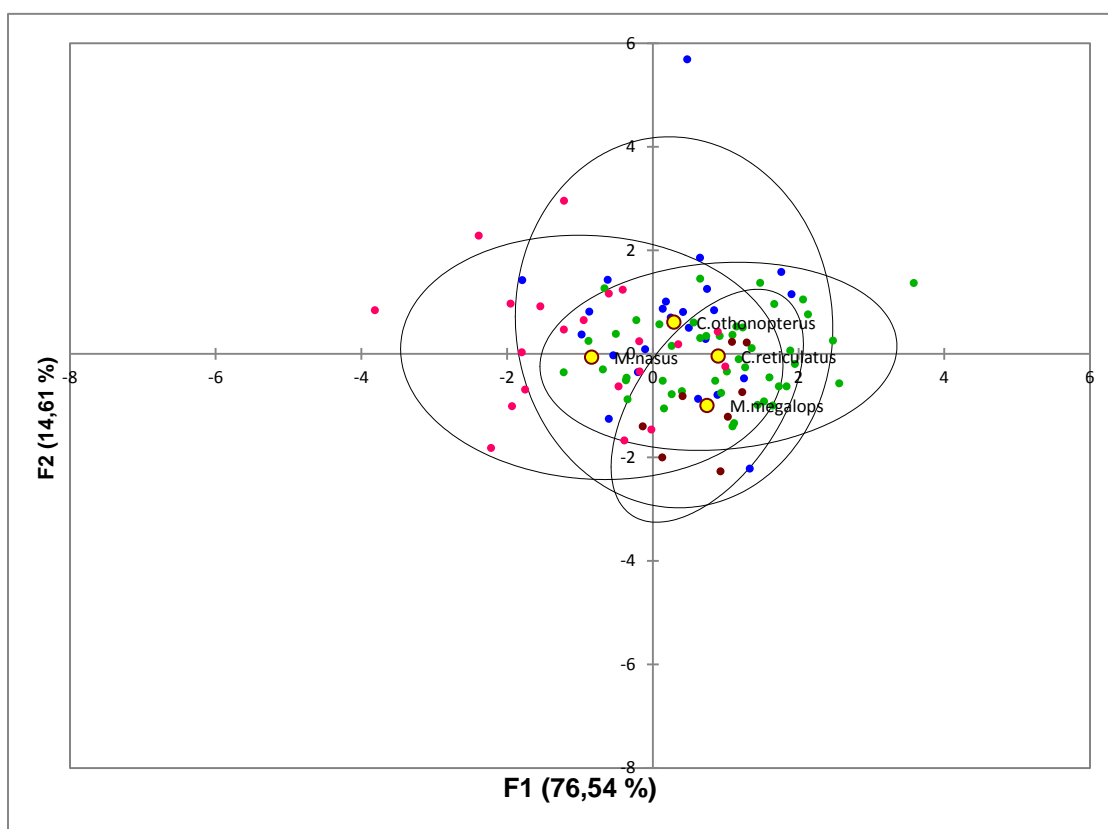


Figura 9. Análisis discriminante de las proporciones corporales de las especies: *Cynoscion othonopterus* (azul), *Cynoscion reticulatus* (verde), *Micropogonias megalops* (rojo) y *Menticirrhus nasus* (rosa). Centroides (amarillo).

La matriz de clasificación con todas las proporciones corporales, mostró que solo el 12.5% de las larvas de *Cynoscion othonopterus* se diferenciaron del resto de las especies. Así como, el 70.2% de las larvas de *Cynoscion reticulatus*, el 12.5% de las larvas de *Micropogonias megalops* y el 81.8% de las larvas de *Menticirrhus nasus* (Tabla 8).

Tabla 8. Matriz de clasificación de las especies identificadas, utilizando seis proporciones (LC/LN, AM/LN, LPA/LN, LPS/LN, DO/LC y H/LC) corporales de larvas en estadio de preflexión.

de \ a	C. othonopterus	C. reticulatus	M. megalops	M. nasus	Tota l	% correcto
<i>C. othonopterus</i>	3	12	1	8	24	12.5
<i>C. reticulatus</i>	1	33	1	12	47	70.2
<i>M. megalops</i>	0	6	1	1	8	12.5
<i>M. nasus</i>	1	11	0	54	66	81.8
Total	5	62	3	75	145	62.7

De las seis proporciones corporales utilizadas para el análisis discriminante, se obtuvieron tres proporciones LC/LN ($p= 0.04$), AM/LN ($p= 0.008$) y LPS/LN ($p= 0.03$) que presentaron diferencias significativas entre las larvas de las especies. Se utilizaron estas tres proporciones en un nuevo análisis discriminante (Tabla.9). Sin embargo, la mayoría de las larvas se sobrepusieron, mostrando en el la raíz 1 (eje x) el 83.7% de la varianza y en la raíz 2 (eje y) el 10.02% (Fig.10).

Tabla 9. Proporciones utilizadas en el análisis discriminante para las cuatro especies: *Cynoscion othonopterus*, *Cynoscion reticulatus*, *Micropogonias megalops* y *Menticirrhus nasus*.

	Lambda de Wilks	F	p	R ²
LC/LN	0.5342	2.7582	0.0447*	0.6177
AM/LN	0.5484	4.0388	0.0086*	0.4835
LPA/LN	0.5184	1.3387	0.2644	0.9776
LPS/LN	0.5369	2.9960	0.0330*	0.9766
DO/LN	0.5112	0.6833	0.5636	0.4220
H/LC	0.5304	2.4127	0.0694	0.0522

* $p < 0.05$

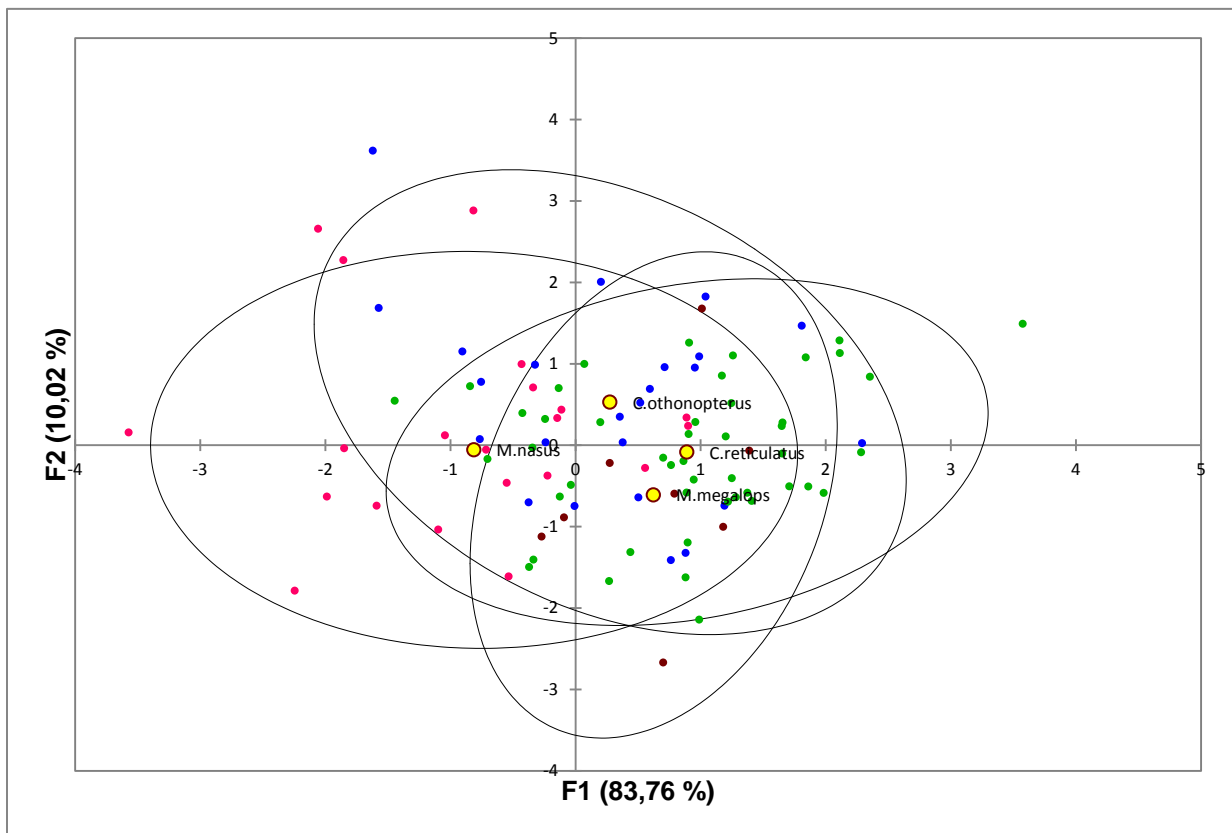


Figura 10. Análisis discriminante con tres proporciones corporales (LC/LN, AM/LN y LPS/LN) de las especies: *Cynoscion othonopterus* (azul), *Cynoscion reticulatus* (verde), *Micropogonias megalops* (rojo) y *Menticirrhus nasus* (rosa). Centroides (amarillo).

La matriz de clasificación con estas tres variables mostró que solo el 12.5% de las larvas de *Cynoscion othonopterus* se diferenciaron del resto de las especies. Así como, el 65.9% de las larvas de *Cynoscion reticulatus* y el 81.8% de las larvas de *Menticirrhus nasus*. Las larvas de *Micropogonias megalops* fueron clasificadas como otras especies (Tabla.10).

Tabla 10. Matriz de clasificación de las especies identificadas, utilizando tres proporciones corporales (LC/LN, AM/LN y LPS/LN) de larvas en estadio de preflexión.

de \ a	C. othonopterus	C. reticulatus	M. megalops	M. nasus	Total	% correcto
<i>C. othonopterus</i>	3	12	0	9	24	12.50
<i>C. reticulatus</i>	1	31	1	14	47	65.96
<i>M. megalops</i>	1	5	0	2	8	0.00
<i>M. nasus</i>	1	11	0	54	66	81.82
Total	6	59	1	79	145	60.69

8.3.2. Descripción de las especies

***Micropogonias megalops* (Gilbert, 1890)**

Morfometría

Las larvas de esta especie crecen aproximadamente el doble su longitud total entre la preflexión y la postflexión. La proporción entre la longitud cefálica (LC/LN) y la altura máxima (AM/LN) en relación a la longitud notocordal se conservó en los diferentes estadios de desarrollo (Tabla 11).

Preflexión (1.8 – 2.68 mm)

Las larvas presentaron una cabeza grande y abultada, boca formada y ojos relativamente grandes y pigmentados. El margen del cuerpo estuvo rodeado por una membrana transparente, denominada aleta primordial (Fig. 11).

Las proporciones tomadas en este estadio mostraron que la proporción de la longitud preanal en relación a la longitud notocordal (LPA/LN) representó la cuarta parte de la LN. La proporción del diámetro del ojo en relación a la longitud cefálica (DO/LC) fue ligeramente mayor que la del hocico en relación a la longitud cefálica (H/LC) (Tabla 11).

Flexión (2.69 – 3.90 mm)

Durante este estadio la longitud preanal en relación a la longitud notocordal (LPA/LN) representó la sexta parte de la de la longitud notocordal (LN). En la región cefálica, la proporción del hocico en relación a la longitud cefálica (H/LC) fue ligeramente más grande que la del diámetro del ojo en relación a la longitud cefálica (DO/LC) (Tabla 11).

Postflexión (3.91 – 6.99 mm)

Durante este estadio longitud preanal en relación a la longitud notocordal (LPA/LN) representó la décima parte de la longitud notocordal. La proporción del DO/LC fue ligeramente más grande que la del H/LC y la del LPA/LN fue relativamente más grande que la LPS/LN (Tabla 11).

Tabla 11. Proporciones corporales promedio y desviación estándar, de larvas de *Micropogonias megalops*. n = número de larvas.

Proporción del cuerpo	Preflexión ($n = 8$)	Flexión ($n = 13$)	Postflexión ($n = 87$)
LN	2.315±0.27	3.324±0.88	5.164±0.67
LC/LN	0.305±0.05	0.308±0.05	0.281±0.03
AM/LN	0.289±0.04	0.312±0.05	0.294±0.03
LPA/LN	0.538±0.04	0.521±0.06	0.516±0.02
LPS/LN	0.462±0.04	0.481±0.06	0.485±0.02
DO/LC	0.383±0.05	0.344±0.10	0.347±0.06
H/LC	0.245±0.09	0.361±0.11	0.329±0.06

Merística

Las larvas de *M. megalops* presentaron una moda de 25 miómeros. En estadio de preflexión presentaron las modas de 6 a 8 miómeros preanales y de 16 a 20 postanales. Durante la flexión presentaron de 6 a 10 miómeros preanales y de 18 a 20 postanales. En postflexión presentaron de 6 a 8 miómeros preanales y 17 a 20 postanales (Tabla 12).

Desde la larva más pequeña colectada (1.80 mm) se observó el pliegue de la aleta pectoral. La aparición de radios o elementos de las aletas comenzó a los 2.60 mm en el estadio de preflexión; los elementos de las pectorales fueron los primeros en aparecer (Fig. 11 y Tabla 12), seguidos de los primeros radios de la aleta dorsal. Durante el estadio de flexión (2.70 - 3.90 mm) se notó claramente que las aletas pectorales, dorsal, anal y caudal ya contaban con elementos (Fig. 11 y Tabla 12). La formación completa de la placa hipúrica se observó a los 4.00 mm. Las aletas pectoral y caudal completaron su formación durante la postflexión (4.00 – 6.99 mm) (Tabla 12 y Fig. 11).

Tabla 12. Datos merísticos de los estadios tempranos de *Micropogonias megalops*.

	Preflexión (intervalo)	Flexión (intervalo)	Postflexión (intervalo)
Miómeros			
Totales	24-26	24-26	24-26
Preanales	6-8	6-10	6-8
Postanales	16-20	15-20	17-20
Aletas			
Anal	-----	(I-5)-7	(I-6)-(II-8)
Dorsal	-----	(I-16)-20	(III-19)-27
Pectoral	12-14	12-14	15-18
Pélvica	-----	-----	3-4
Caudal	-----	5+4- 8+7	7+8- 9+8

Patrón de pigmentación

Durante la etapa de preflexión las larvas presentaron tres pigmentos sobre la órbita del ojo, y uno o dos pigmentos sobre la mandíbula inferior. Además presentaron de uno a dos pigmentos sobre la nuca. Se encontraron tres pigmentos dispersos sobre la línea media preanal: uno de ellos, el más cercano al ano, de forma estrellada. Se observaron de dos a cuatro pigmentos dispersos sobre la masa visceral y la superficie dorsal del peritoneo se encontró fuertemente pigmentada (Fig. 11). Sobre la línea ventral posterior al ano se observaron de 10 a 17 pigmentos dispuestos entre los miómeros 10 y 23. Dos de ellos estrellados entre los miómeros 16 y 17. Durante este estadio no se registraron pigmentos sobre la superficie dorsal del notocordio.

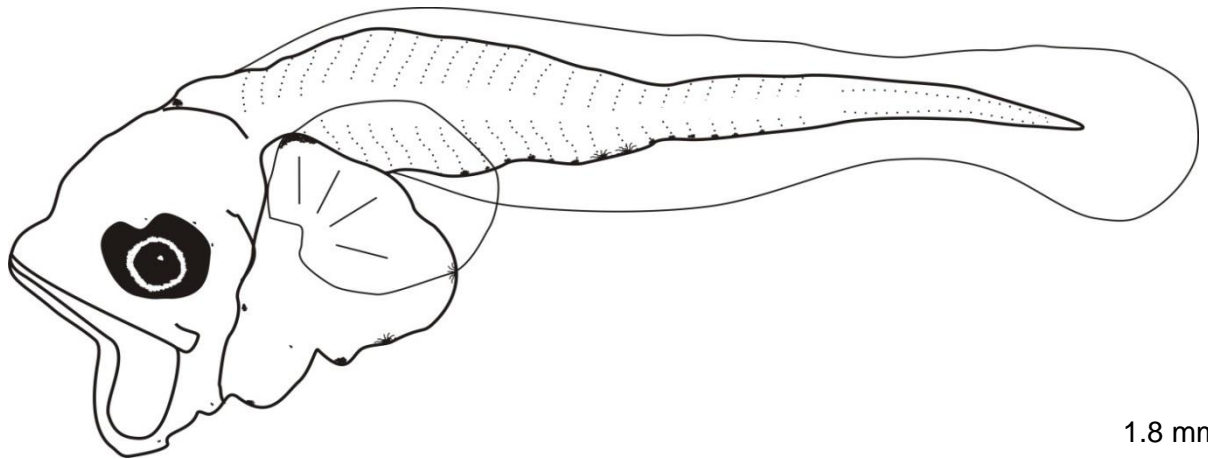
Durante la flexión aparecieron dos pigmentos más sobre la órbita del ojo, el número de pigmentos sobre la mandíbula inferior disminuyó un pigmento al igual que los pigmentos sobre la nuca (Fig.11).

Los tres pigmentos sobre la línea media preanal se mantuvieron, el más alejado al ano de forma estrellada. Se observaron siete pigmentos dispuestos sobre la superficie de la masa visceral y la base del peritoneo se encontró fuertemente pigmentada (Fig.11).

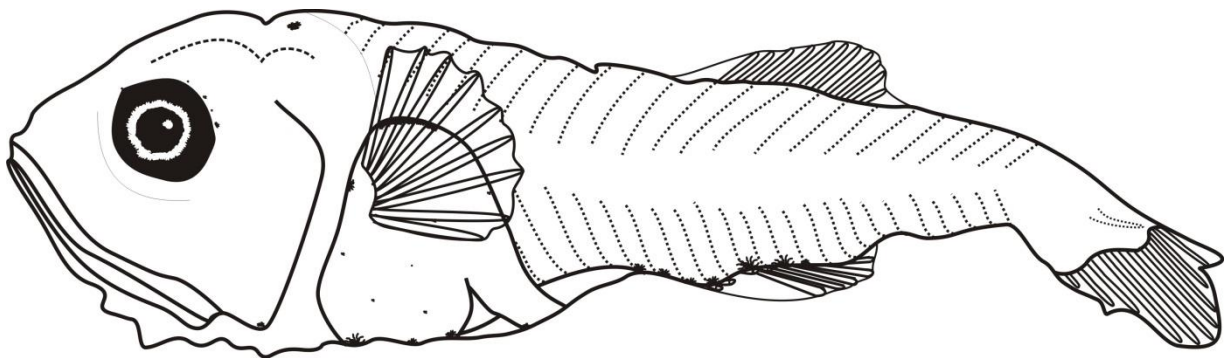
Los pigmentos postanales disminuyeron, se observaron de cuatro a ocho pigmentos dispersos entre los miómeros 11 y 19. Dos de ellos estrellados sobre los miómeros 16 y 18 (Fig.11).

Durante la postflexión se incrementó un pigmento en la órbita del ojo, sobre la mandíbula se observaron dos pigmentos: uno sobre el ángulo de la mandíbula y el otro arriba del labio superior. Durante este estadio ya no se observaron pigmentos sobre la nuca (Fig.11).

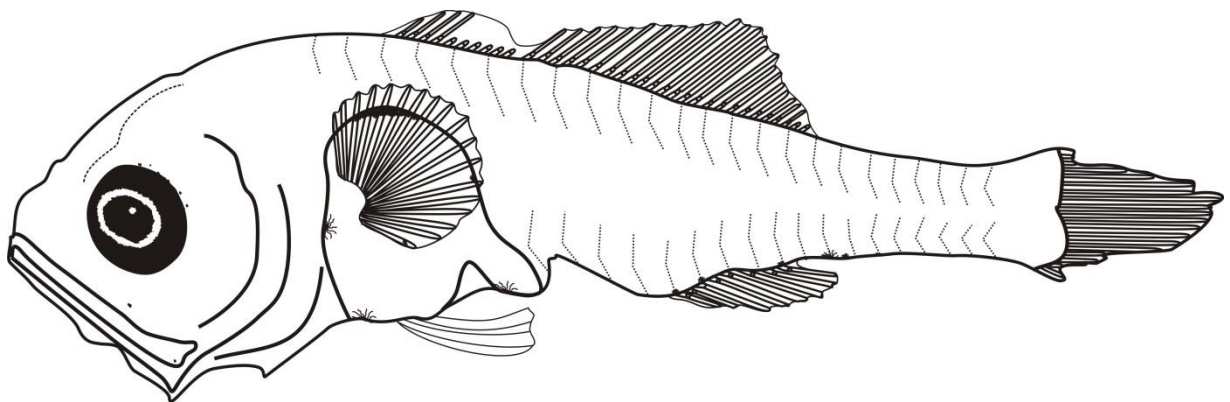
El número de pigmentos sobre la línea media preanal disminuyó a uno o dos pigmentos estrellados. La superficie de la masa visceral se observó pigmentada, con un pigmento estrellado a la altura de la base de la aleta pectoral y el borde del peritoneo se encontró fuertemente pigmentado. Sobre la línea ventral postanal se observaron de uno a seis pigmentos esparcidos entre los miómeros 11 y 18. Uno de ellos siempre evidente en el miómero 17. Durante la postflexión (4.0 mm de longitud total) no se registraron pigmentos dorsales (Fig.11).



1.8 mm



2.7 mm



4.0 mm

Figura 11. Larvas de *Micropogonias megalops* en preflexión (1.8 mm), flexión (2.7 mm) de LN y postflexión (4.00 mm) de longitud total.

***Menticirrhus nasus* (Günther, 1869)**

Morfometría

Las larvas de *M. nasus* incrementaron aproximadamente al triple su longitud total entre la preflexión y la postflexión. La proporción de la longitud cefálica en relación a la longitud notocordal (LC/LN) se mantuvo parecida durante estos dos estadios (Tabla 13).

Preflexión (1.38 – 3.35 mm)

Durante este estadio el margen del cuerpo estuvo rodeado por una membrana transparente, denominada aleta primordial (Fig.12A).

En éste estadio la proporción LPA/LN representó la cuarta parte de la longitud notocordal, esta proporción fue mayor que las proporciones LPS/LN y AM/LN. Para la región cefálica, la proporción DO/LC fue ligeramente más grande que la proporción H/LC (Tabla 13).

Postflexión (6.20 – 6.90 mm)

Las proporciones LPA/LN y LPS/LN se mantuvieron parecidas al estadio de preflexión. La proporción del DO/LC continuó siendo relativamente más grande que la proporción H/LC (Tabla 13).

Tabla 13. Proporciones corporales promedio y desviación estándar de larvas de *Menticirrhus nasus*. *n* = número de larvas.

Proporción del cuerpo	Preflexión (<i>n</i> = 66)	Postflexión (<i>n</i> = 4)
LN	2.246±0.48	6.588±0.43
LC/LN	0.322±0.04	0.324±0.03
AM/LN	0.373±0.06	0.311±0.02
LPA/LN	0.609±0.06	0.624±0.02
LPS/LN	0.390±0.06	0.376±0.02
DO/LC	0.399±0.08	0.288±0.01
H/LC	0.326±0.11	0.210±0.07

Merística

Todas las larvas presentaron 25 miómeros. Durante la preflexión presentó una moda de 5 miómeros preanales y 20 postanales (Fig.12). En la postflexión presentó 7 miómeros preanales y 18 postanales (Tabla 14 y Fig.13).

La aparición de los elementos de la aleta pectoral comenzó desde la larva más pequeña registrada (1.38 mm), en el estadio de preflexión (Fig.12).

Durante el estadio de postflexión (6.20 - 6.90 mm) la placa hipúrica se encontró completamente formada. Las aletas: pectorales, dorsal, anal y pelvicas contaron con algunos elementos. Durante este estadio la aleta caudal completó su formación (Tabla14 y Fig.13).

Tabla 14. Datos merísticos de los estadios tempranos de *Menticirrhus nasus*.

	Preflexión (intervalos)	Postflexión (intervalo)
Miómeros		
Totales	25	25
Preanales	5	7
Postanales	20	18
Aletas		
Anal	-----	8
Dorsal	-----	(I-16)-(II-25)
Pectoral	10-16	14-15
Caudal	-----	9+7-9+8

Patrón de pigmentación

Preflexión.

Durante la etapa de preflexión las larvas presentaron de 8 a 18 pigmentos cefálicos; tres o cuatro dispuestos sobre la órbita del ojo, uno o dos sobre los huesos frontales, tres o cuatro en la región preopercular, cuatro o siete sobre el pliegue de la mandíbula inferior. Se encontraron de 10 a 38 pigmentos dispersos sobre la superficie de la masa visceral y la línea media preanal, con uno o tres estrellados. La superficie dorsal del peritoneo se encontró fuertemente pigmentada, desde la parte anterior de la base del primordio de la aleta pectoral hasta la posición posterior del tronco a la altura de la abertura anal (Fig.12).

Sobre la línea media ventral postanal se observaron más de 30 pigmentos dispuestos entre los miomeros 3 y 23, así como una línea media lateral pigmentada sobre el notocordio. La superficie dorsal presentó de 11 a 27 pigmentos entre los miomeros 1 y 20 (Fig. 12).

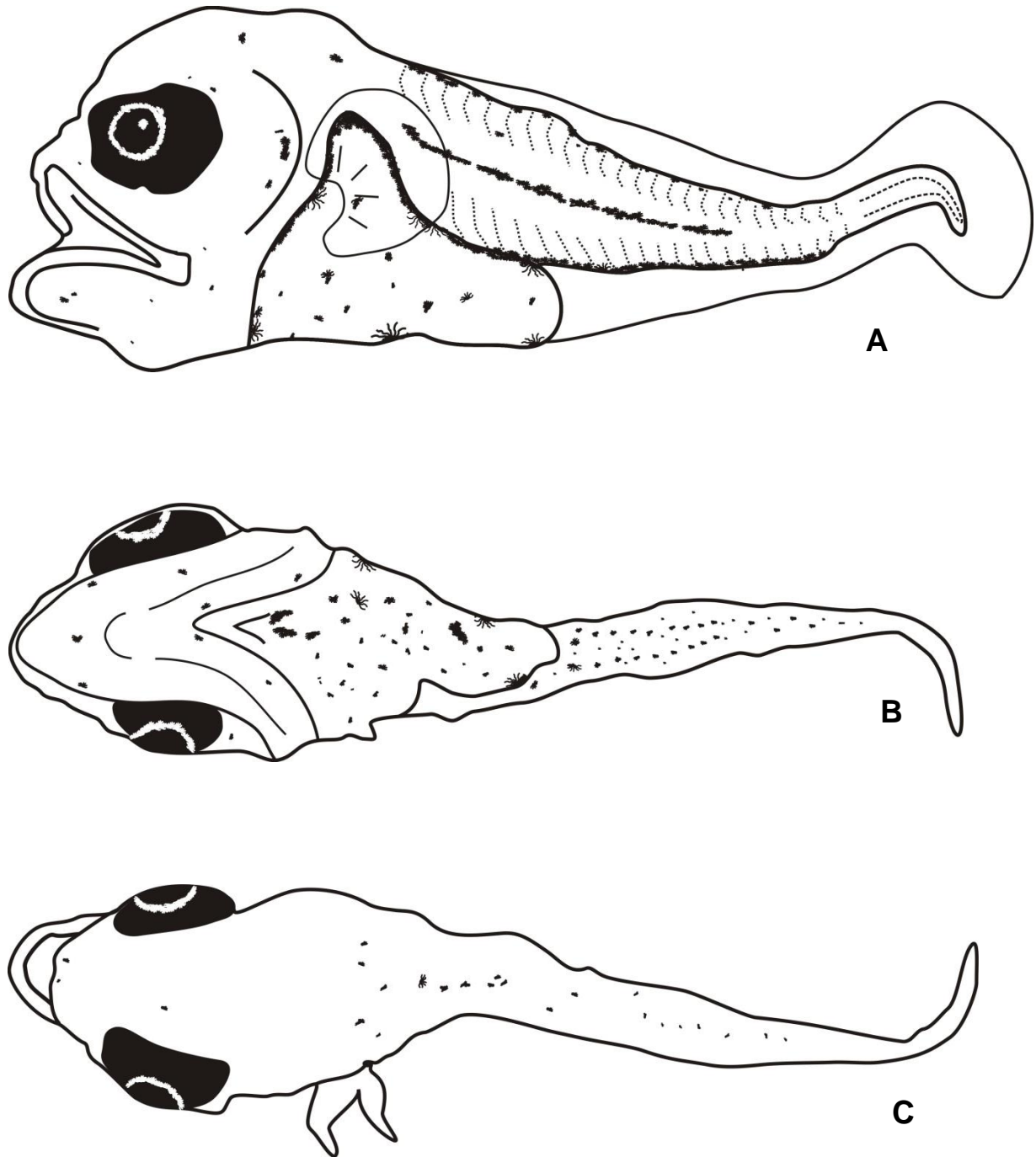


Figura 12. Larva de *Menticirrhus nasus* en estadio de preflexión (1.4 mm de LN). Vista en posición lateral (A), ventral (B) y dorsal (C).

Postflexión

Durante la postflexión el número de pigmentos cefálicos se incrementó a más de 30; de 20 a 25 pigmentos dispuestos sobre el pliegue de la mandíbula superior y el pliegue de la mandíbula inferior, ocho sobre la base y órbita del ojo, de ocho a nueve sobre los huesos frontales, así como cinco o seis pigmentos estrellados sobre el opérculo (Fig.13).

La superficie de la masa visceral se observó pigmentada; con más de 10 pigmentos estrellados, cinco o siete pigmentos sobre la línea media preanal, así como un parche de pigmentos cercano al ano, la base del peritoneo fuertemente pigmentada (Fig.13).

Sobre la línea media ventral postanal el número de pigmentos disminuyó a 14, dispuestos entre los miómeros 7 y 24. Sobre la línea media lateral del notocordio el número de pigmentos incrementó más de 30 pigmentos. La superficie dorsal presentó más de 20 pigmentos estrellados entre los miómeros 2 y 21 (Fig.13).

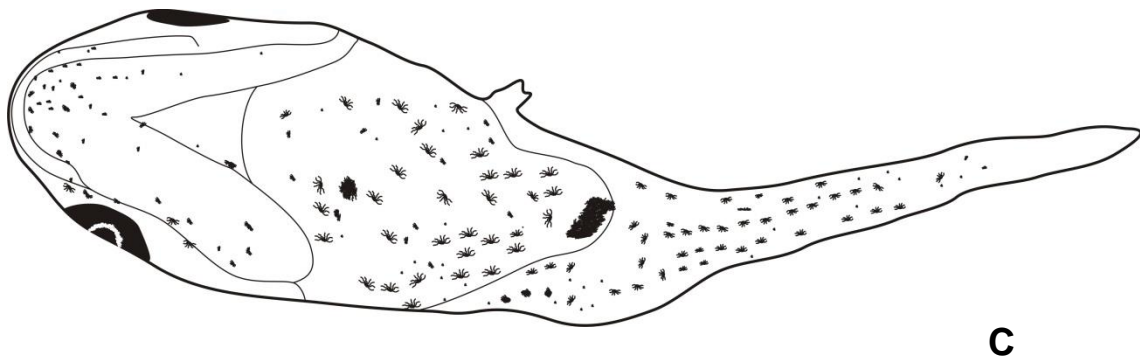
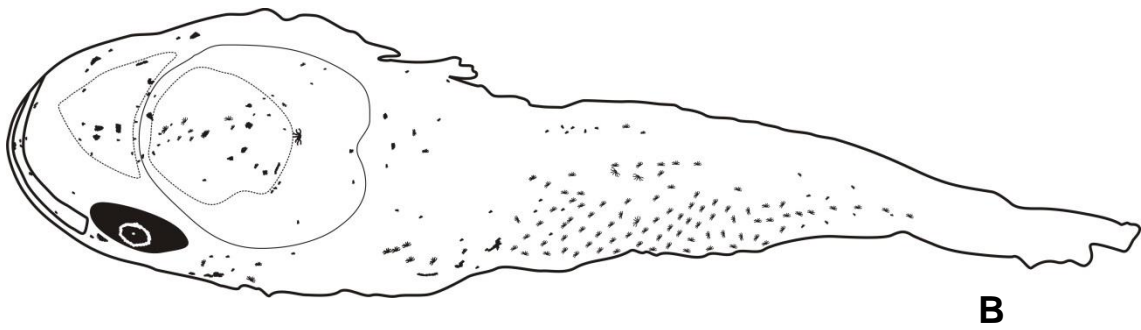
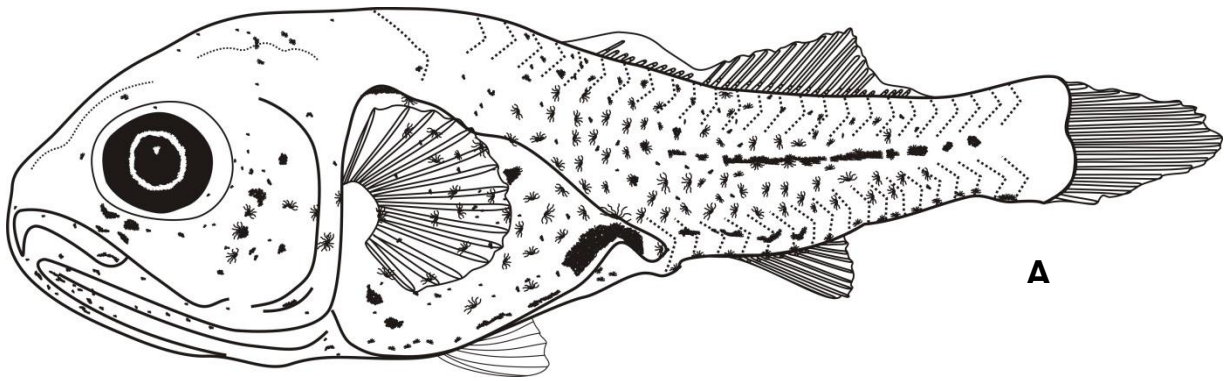


Figura 13. Larva de *Menticirrhus nasus* en estadio de postflexión (6.2 mm de LN), vista lateral (A), dorsal (B) y ventral (C).

***Cynoscion othonopterus* (Jordan y Gilbert, 1881)**

Morfometría

Las larvas de esta especie incrementaron aproximadamente al doble su longitud total entre la preflexión y la postflexión. Las proporciones LC/LN y AM/LN se mantuvieron parecidas entre los dos estadios (Tabla 15).

Preflexión (1.49 – 3.38 mm)

La proporción LPA/LN en éste estadio representó la cuarta parte de la longitud notocordal. En la región cefálica, la proporción DO/LC fue ligeramente más grande que la del H/LC (Tabla 15).

Postflexión (3.53 – 4.96 mm)

Durante éste estadio la proporción de LPA/LN representó la sexta parte de la longitud total. Para la región cefálica, la proporción H/LC fue más grande que la de DO/LC (Tabla 15).

Tabla 15. Proporciones corporales promedio y desviación estándar de larvas de *Cynoscion othonopterus*. *n* = número de larvas.

Proporción del cuerpo	Preflexión (<i>n</i> = 24)	Postflexión (<i>n</i> = 4)
LN	2.316±0.48	4.186±0.59
LC/LN	0.335±0.07	0.367±0.05
AM/LN	0.353±0.06	0.374±0.01
LPA/LN	0.558±0.08	0.636±0.03
LPS/LN	0.447±0.07	0.363±0.03
DO/LC	0.383±0.07	0.298±0.07
H/LC	0.329±0.12	0.408±0.07

Merística

Las larvas de esta especie presentaron una moda de 25 miómeros. Durante el estadio de preflexión presentaron de 6-12 miómeros preanales y de 13-19 miómeros postanales (Fig.14). Durante la postflexión presentaron de 10-14 miómeros preanales y de 11-15 postanales (Tabla 16 y Fig.15).

El pliegue de la aleta pectoral se observó desde la larva más pequeña (1.49 mm) durante el estadio de preflexión. La aparición de los radios de las aletas

comenzó a los 1.88 mm en el estadio de preflexión; los radios pectorales son los primeros en aparecer completando su desarrollo en tallas de 2.11 mm.

Durante el estadio de postflexión (3.53 – 4.96 mm) se pudo notar claramente que las aletas pectorales, dorsal, anal, caudal y pélvicas ya contaban con elementos. (Fig.15 y Tabla 16).

Tabla 16. Datos merísticos de los estadios tempranos de *Cynoscion othonopterus*.

	Preflexión (intervalos)	Postflexión (intervalos)
Miómeros		
Totales	25	25
Preanales	6,12	10-14
Postanales	13-19	11-15
Aletas		
Anal	-----	10-11
Dorsal	-----	III-23
Pectoral	8-16	16
Caudal	-----	8+7

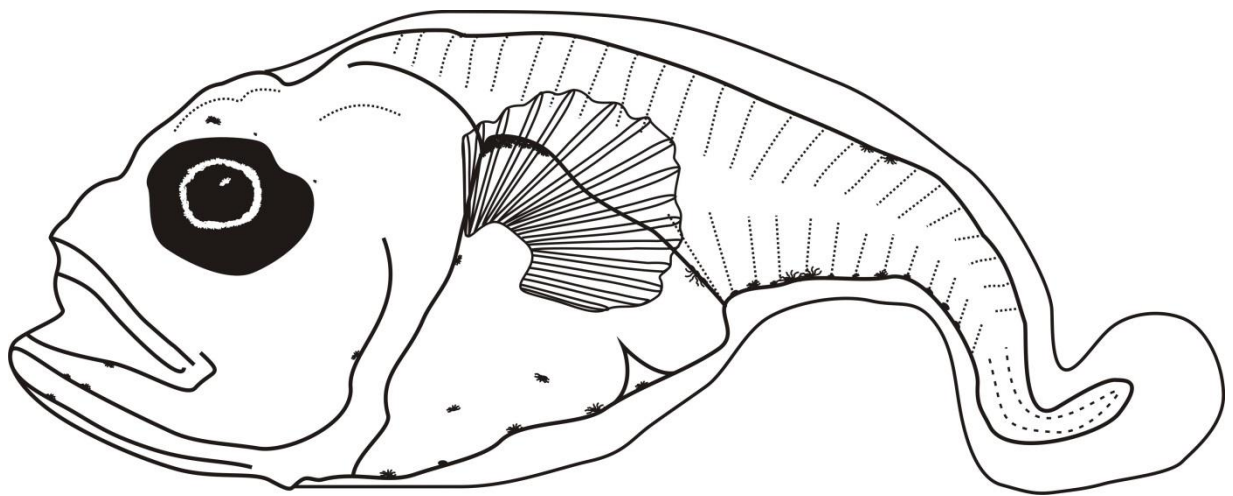
Patrones de pigmentación.

Preflexión

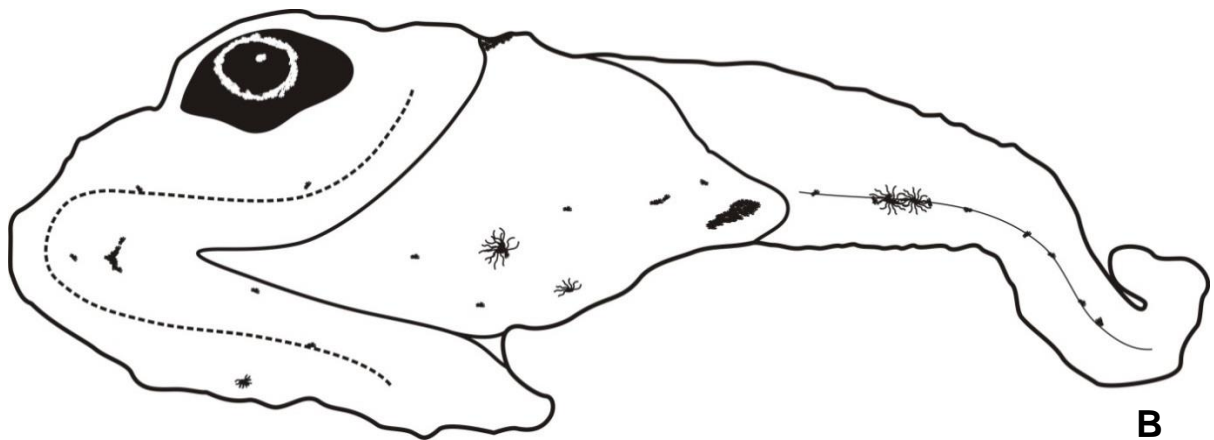
Durante esta etapa las larvas presentaron de siete a 10 pigmentos cefálicos; tres pigmentos sobre el pliegue de la mandíbula inferior, tres o cuatro pigmentos sobre la órbita del ojo y un pigmento sobre el borde preopercular (Fig. 14A), así como cuatro pigmentos dispuestos sobre la base de la mandíbula inferior (Fig.14B).

Sobre la línea media preanal se observaron de cuatro a seis pigmentos: dos o tres de ellos estrellados. Presentó de tres a siete pigmentos dispersos sobre la masa visceral; uno de ellos a la altura de la base de la aleta pectoral. La superficie dorsal del peritoneo se observó fuertemente pigmentada (Fig. 14B).

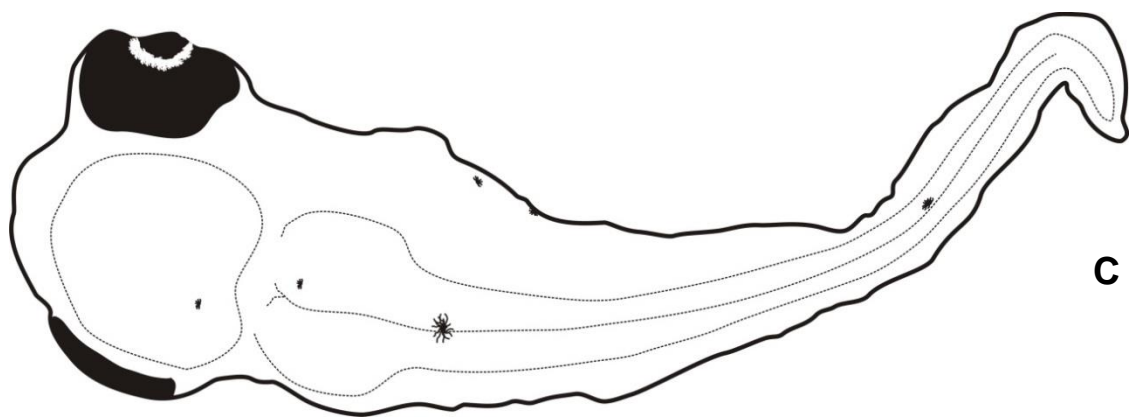
Sobre la línea media ventral posterior al ano se observaron de 12 a 20 pigmentos entre los miómeros 12 y 24; dos de ellos estrellados entre los miómeros 15 y 16 (Fig. 14 A y B). La superficie dorsal presentó uno o dos pigmentos entre los miómeros 16 y 17 (Figs. 14 A y C), así como un pigmento en los primeros miómeros.



A



B



C

Figura 14. Larva de *Cynoscion othonopterus* en estadio de preflexión (1.5 mm de LN). Vista en posición lateral (A), ventral (B) y dorsal (C).

Postflexión.

Durante esta etapa el número de pigmentos cefálicos disminuyó: se observaron dos dispersos en la mandíbula inferior y cuatro sobre la región interpreopercular, debajo del borde preopercular. En este estadio ya no se observaron pigmentos sobre la órbita del ojo (Fig.15A).

El número de pigmentos dispersos sobre la masa visceral y la línea media preanal aumentaron a 13 pigmentos. El peritoneo se encontró fuertemente pigmentado (Figs. 15A y B).

Sobre la línea ventral postanal se observaron cuatro pigmentos entre los miómeros 19 y 23; uno estrellado en el miómero 19. En la línea media lateral de la notocorda se observaron cuatro pigmentos, uno de ellos fuertemente pigmentado en el miómero 18. Sobre la superficie dorsal se observó un pigmento en el miómero 19 (Figs.15A y B).

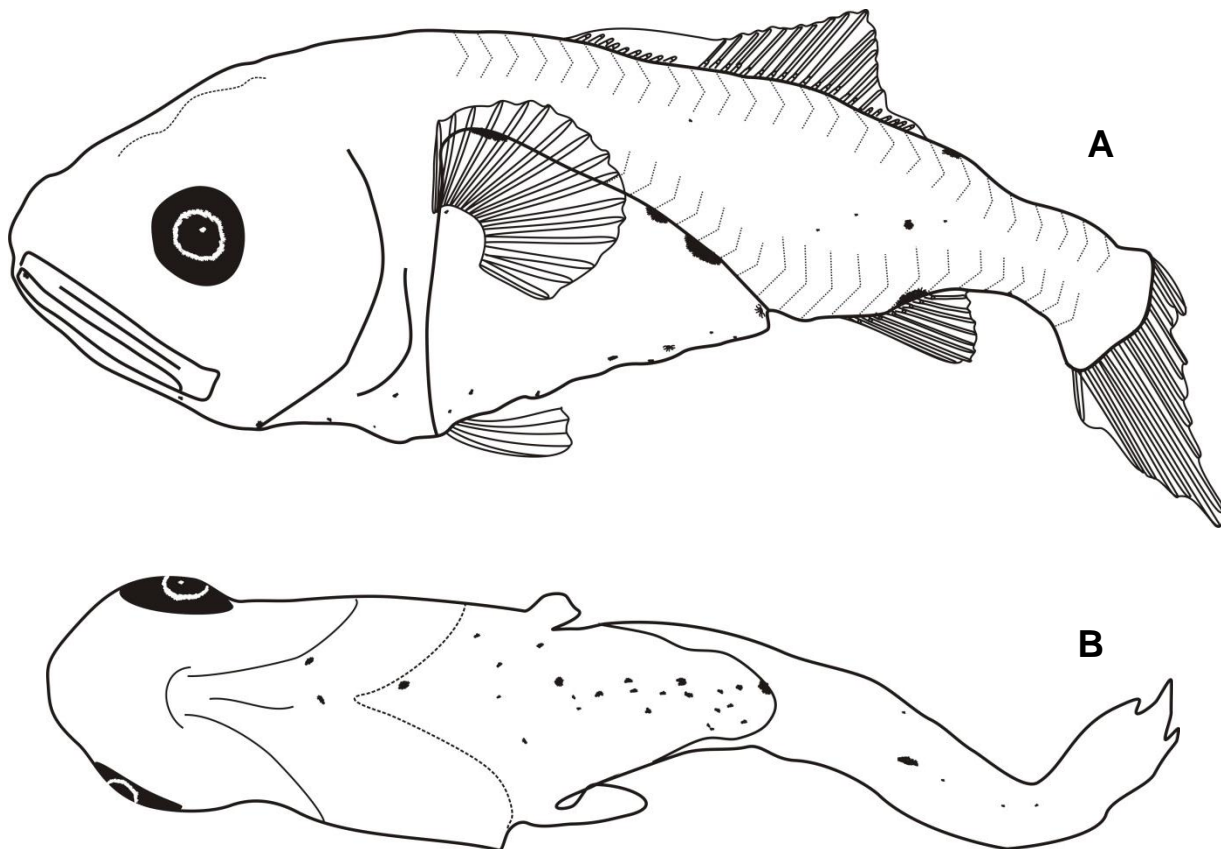


Figura 15. Larva de *Cynoscion othonopterus* en estadio de postflexión (3.50 mm de longitud total). Vista en posición lateral (A) y ventral (B).

***Cynoscion reticulatus* (Günther, 1864)**

Morfometría

Las larvas de esta especie solo se registraron en preflexión, presentaron una LN promedio de 2.20 mm (Tabla 17).

Preflexión (1.26 – 3.35 mm)

La proporción LPA/LN representó la cuarta parte de la LN. Para la región cefálica, la proporción DO/LC fue ligeramente más grande que la proporción H/LC (Tabla 17).

Tabla 17. Proporciones corporales promedio y desviación estándar de larvas de *Cynoscion reticulatus*. *n* = número de larvas.

Proporción del cuerpo	Preflexión (<i>n</i> = 47)
LN	2.208±0.42
LC/LN	0.292±0.05
AM/LN	0.313±0.04
LPA/LN	0.503±0.07
LPS/LN	0.496±0.07
DO/LC	0.390±0.08
H/LC	0.311±0.10

Merística

Las larvas de esta especie presentaron una moda de 25 miómeros. Desde la larva más pequeña descrita (1.26 mm) se observó el pliegue de la aleta pectoral. La formación de los radios de las aletas pectorales comenzó a los 1.37 mm. Las demás aletas (anal, dorsal, pélvicas y caudal) no se presentaron durante este estadio (Fig. 16A).

Pigmentación

En la región cefálica se observaron de dos a seis pigmentos; dos en la base de la mandíbula inferior y uno en el mentón, un pigmento sobre el opérculo y de uno a tres pigmentos dispuestos alrededor de la órbita del ojo (Figs.16A y B).

Sobre la línea media preanal se observó un pigmento estrellado, alejado al ano. Sobre la base de la superficie visceral se encontraron de 4 a 10 pigmentos esparcidos, uno de ellos fuertemente estrellado en el borde de la masa visceral. La base del peritoneo se encontró fuertemente pigmentada (Figs.16A y B).

En la línea media ventral postanal se observaron de 4 a 20 pigmentos entre los miómeros 7 y 21; dos de ellos estrellados entre los miómeros 17 y 18 (Figs.16A y B).

Se observaron de uno a dos pigmentos dorsales, dispuestos sobre los dos primeros miómeros y un pigmento en la región dorsal de la notocorda (Fig. 16C).

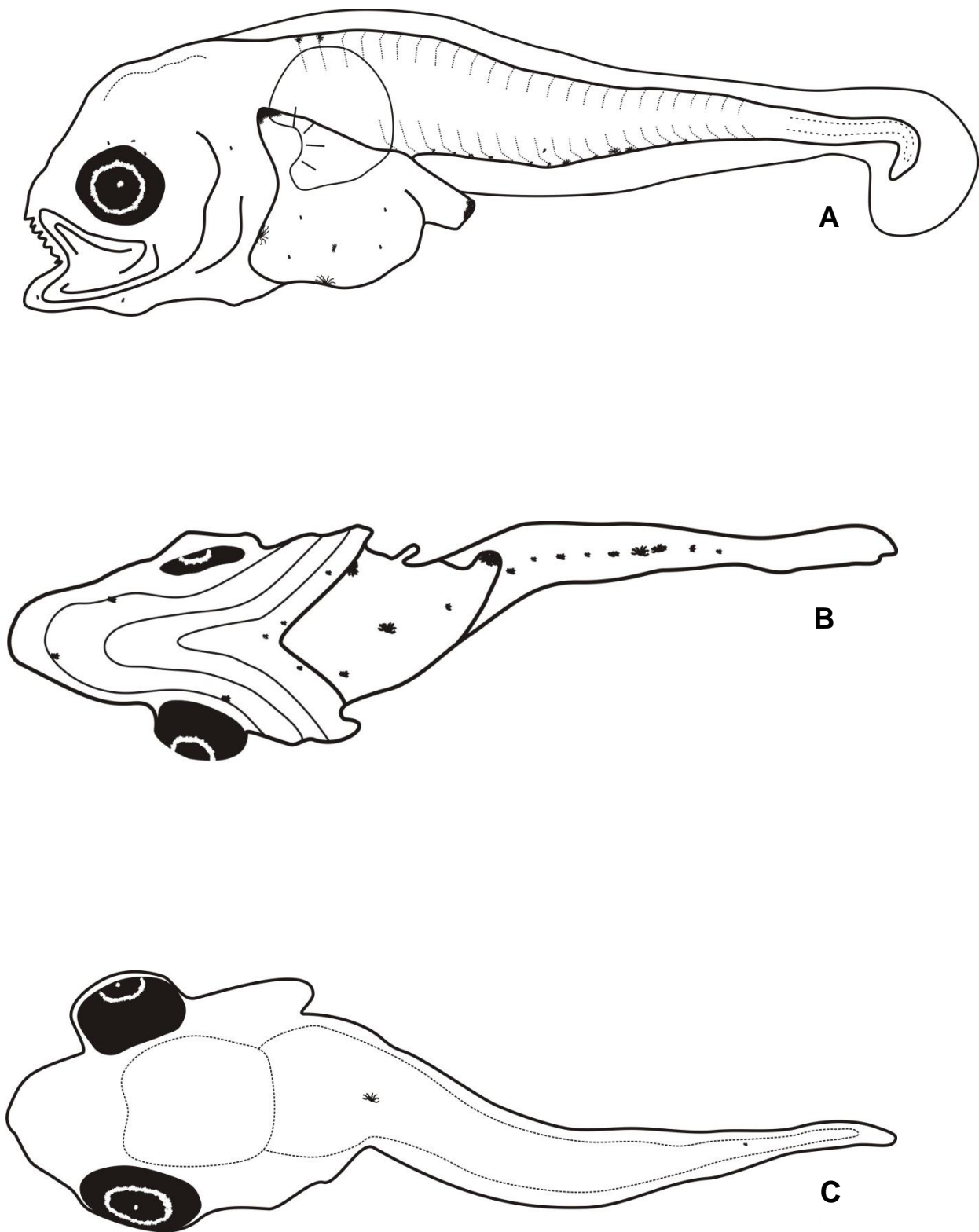


Figura 16. Larva de *Cynoscion reticulatus* en estadio de preflexión (1.3 mm de LN). Vista en posición lateral (A), ventral (B) y dorsal (C).

8.4. Número de larvas totales y presencia en las estaciones de muestreo.

Las larvas recolectadas durante septiembre del 2012, se encontraron representadas por cuatro especies, con el siguiente orden de abundancia: *Cynoscion reticulatus* (50%), *Micropogonias megalops* (30%), *Menticirrhus nasus* (14%) y *Cynoscion othonopterus* con (6%) (Fig.17).

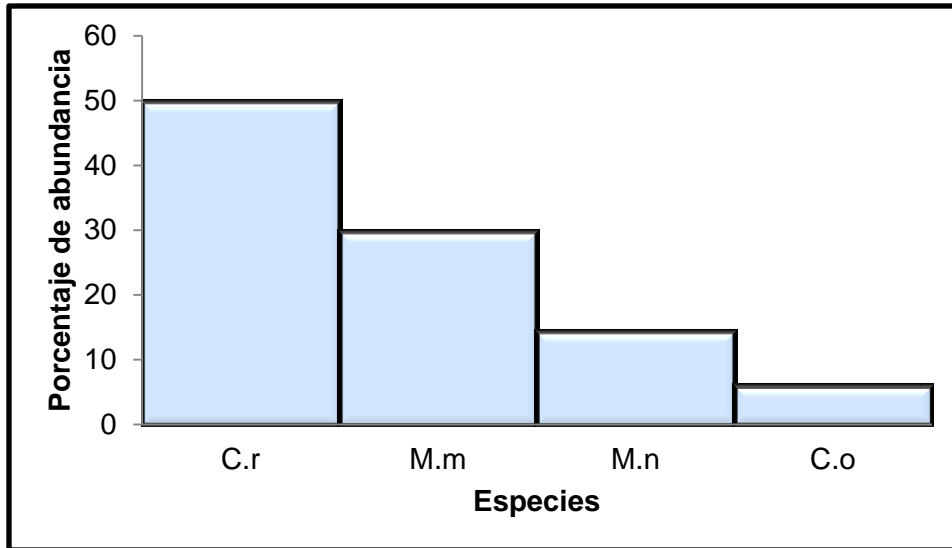


Figura 17. Porcentaje de larvas de cada especie *Cynoscion reticulatus* (C.r), *Micropogonias megalops* (M.m), *Menticirrhus nasus* (M.n) y *Cynoscion othonopterus* (C.o) en las estaciones de muestreo.

Todas las especies se distribuyeron principalmente en la zona de amortiguamiento del AGC, incluyendo el refugio de la vaquita marina; donde *Menticirrhus nasus* tuvo la mayor frecuencia de ocurrencia (Fig. 18). Cabe señalar que las larvas de *Micropogonias megalops* y *Cynoscion othonopterus* fueron las únicas que en su distribución alcanzaron la zona núcleo del AGC. En lo que concierne a la presencia de las larvas en las estaciones de muestreo, se encontró que la especie con mayor presencia en la red de estaciones fue *Menticirrhus nasus* debido a que se encontró en 23 estaciones, representando el 31% del total de las estaciones muestreadas. *Micropogonias megalops* se encontró en 19 estaciones, representando el 26%, *Cynoscion reticulatus* se presentó en 16 estaciones, representando el 24% y *Cynoscion othonopterus* se encontró en 12 estaciones, representando el 15% (Fig. 18).

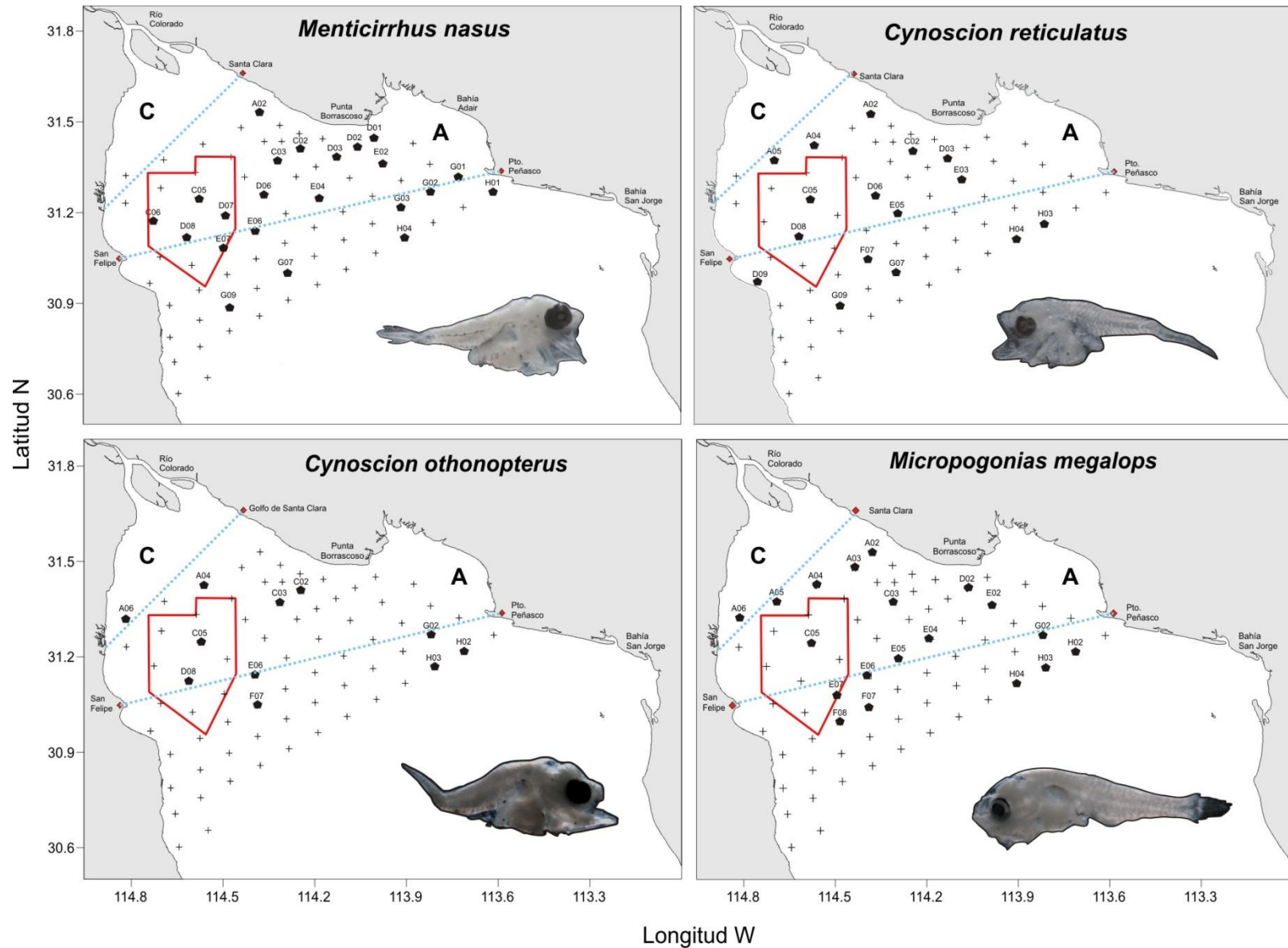


Figura 18. Mapas de presencia (pentágono negro)-ausencia (cruces) de las especies de Sciaenidae en las estaciones de muestreo: C) zona núcleo, B) zona de amortiguamiento y pentágono (rojo) refugio de la vaquita marina.

9. DISCUSIÓN

9.1. *Identificación taxonómica de larvas de Sciaenidae.*

Los resultados del presente trabajo, mostraron que las larvas encontradas coinciden con las características morfológicas y merísticas representativas de la familia Sciaenidae (Moser, 1996). Sin embargo, morfológicamente no se pudieron identificar a nivel de especie en primera instancia por métodos tradicionales de taxonomía merística y morfométrica, por lo que previo al análisis genético las larvas se agruparon en cuatro morfotipos. Esto se debe, en cierta forma a la falta de características diagnósticas descriptivas a nivel de especie y a que en esta familia en especial, las congéneres comparten características morfológicas y merísticas que se sobreponen entre sí (Lakra *et al.*, 2009). El número de morfotipos de Sciaenidae (cuatro) encontrados en septiembre del 2012 fue menor a los reportados en estudios previos para la zona. Sánchez-Velasco *et al.* (2011) y Jiménez-Rosenberg *et al.* (2012), durante junio del 2008 y 2010 respectivamente, reportaron un conjunto de 16 morfotipos para el AGC. La variación en números de morfotipos de este trabajo con los que reportaron Sánchez-Velasco *et al.* (2011) y Jiménez-Rosenberg *et al.* (2012), puede deberse a la época de muestreo, siendo posible que junio sea la época de desove principal de la mayoría de las especies de la familia Sciaenidae en el AGC, evidenciado por un mayor número de morfotipos. Además, las muestras de los estudios mencionados, se obtuvieron mediante muestreo estratificado (5, 10 y 15 m de profundidad), lo que pudo contribuir en una mayor diversidad de morfotipos. En el presente estudio las muestras fueron tomadas solo en el estrato superficial.

Por otra parte, la mayor cantidad de larvas se encontraron en estadio de preflexión (60%) lo que coincide con los resultados de Sánchez-Velasco *et al.* (2011), quienes reportaron que más del 85% de sus larvas recolectadas en el AGC estuvieron en estadio de preflexión. Similar a ese trabajo, Flores-Coto *et al.* (1999) en el Golfo de México encontraron 294 larvas de Sciaenidae de las cuales el 87.3% estaban en preflexión. Estos porcentajes de larvas en preflexión pueden deberse a que los muestreos coincidieron con desoves recientes o a que las larvas estadios de desarrollo más avanzados presentan mayor movilidad, lo que les permite escapar (Houde, 2001).

9.2. Identificación genética

Las limitaciones inherentes a los sistemas de identificación basados en la morfología y merística, plantean el enfoque molecular para el reconocimiento de especies (Steinke *et al.*, 2009). La eficiencia de la identificación de especies por métodos moleculares se evalúa por los niveles de homogeneidad intra-específica y heterogeneidad inter-específica mostrada por el método deseado (Hallden *et al.*, 1994). En este trabajo se utilizaron las fracciones mitocondriales de COI y 16S, mismas que demostraron su alta eficiencia en la identificación de las especies recolectadas de Sciaenidae, con un 100% de soporte estadístico para COI y de 88-99% para 16S. La alta eficiencia de COI se ha reportado en peces marinos adultos y en estadios larvarios (Ward *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2008; Vázquez-Yeomans *et al.*, 2011; Valdez-Moreno *et al.*, 2010), al igual que para 16S (Tawa *et al.*, 2011, 2014; Díaz-Viloria *et al.*, 2013).

Awise (2001) y Hebert *et al.* (2003) propusieron que la variación genética inter-específica es usualmente $> 2\%$ y la variación genética intraespecífica es $< 1\%$. Basándonos en estos criterios, las divergencias genéticas inter-específicas mayores al 2% en los morfotipos 1 y 4 con respecto a los demás morfotipos, confirmaron la existencia de dos especies diferentes. En el morfotipo 2 se encontró que diferentes estadios (preflexión, flexión y postflexión) presentaron divergencias mayores al 10%, indicando que éste morfotipo estaba compuesto por más de una especie. Al comparar el morfotipo 3 con el morfotipo 2 en estadios de flexión y postflexión las divergencias genéticas menores al 2% en ambas fracciones indicaron que ambos morfotipos fueron la misma especie. Esto nos indicó que no se cuentan con las características descriptivas apropiadas para distinguir a las especies o bien que algunos miembros de la familia Sciaenidae comparten características morfológicas entre sí en sus estadios larvarios.

Mediante la comparación de las secuencias de las larvas con las de 15 especies de Sciaenidae de la base de datos del GenBank y las de adultos, se identificaron a nivel de especie los cuatro morfotipos encontrados en el presente trabajo como: *Cynoscion othonopterus*, *Cynoscion reticulatus*, *Micropogonias megalops* y *Menticirrhus nasus*. Donde cada uno de los morfotipos presentó

divergencias genéticas menores al 1% con su especie correspondiente. Esta variación nos confirma la asignación de las especies. De esta forma se demostró que el análisis genético permite la identificación de individuos a nivel de especie sin importar el estadio de desarrollo en el que se encuentre, como se ha reportado en otros estudios (Hyde *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2011; Vázquez-Yeomans *et al.*, 2011; Tawa *et al.*, 2012, 2014). La divergencias genéticas de los morfotipos con las demás especies de Sciaenidae fueron de 6.43% a 23.1% para la fracción COI y de 1.3% a 9.63% para 16S, lo que estuvo de acuerdo con lo propuesto por Avise (2001) y Hebert *et al.* (2003), a excepción del valor del 1.3%. Este valor obtenido con 16S en este trabajo se debió a la baja divergencia genética que presentaron dos especies congénicas: *Cynoscion othonopterus* y *Cynoscion reticulatus*. Esta baja divergencia se ha reportado en otras especies del género *Cynoscion*. Vergara-Chen *et al.*, (2009) observaron divergencias genéticas de 0.6 % entre *Cynoscion xanthulus* y *Cynoscion albus* con la combinación de los genes mitocondriales ATPasa 8/6 y citocromo *b* (*citb*), lo que indico la estrecha relación entre estas especies hermanas.

Morfológicamente el morfotipo 2 se identificó en tres estadios diferentes (preflexión, flexión y postflexión), que genéticamente se identificaron como *Cynoscion reticulatus* (preflexión) y *Micropogonias megalops* (flexión y postflexión). Esto no solo se ha observado en los estadios tempranos, sino que también se ha observado en especies adultas de la familia Sciaenidae. Barreto-Barbosa *et al.* (2014) mediante datos moleculares encontraron que las especies del grupo *Stellifer* con similitudes morfológicas (*Stellifer rastrifer*, *Stellifer stellifer*, y *Stellifer* sp.), formaron un clado estrechamente relacionado con *Ophioscion* y sugirieron que el género *Stellifer* debe ser asignado a un nuevo género o que todo el grupo debe ser asignado a un solo género tomando en cuenta que aún se deben realizar más estudios comparativos de tipo morfológicos y genéticos para este grupo.

El morfotipo 1 y 2 encontrados en el presente estudio fueron especies distintas, a las reportadas por Díaz-Viloria *et al.* (2013) quienes identificaron al morfotipo 1 y 2 en estadio de preflexión como *Cynoscion reticulatus* y *Totoaba macdonaldi* respectivamente. En este estudio el morfotipo 1 se identificó como *Cynoscion othonopterus* y el morfotipo 2 en preflexión se identificó como *Cynoscion*

reticulatus. Esto podría deberse en cierta medida a que algunas especies de Sciaenidae comparten características descriptivas entre sí durante su estadio de preflexión. En algunos especímenes adultos de esta familia también se han reportado problemas en la identificación de especies. Ríos-Medina (2012) en su tesis de maestría evidenció la presencia de cuatro especies de corvinas con gran similitud morfológica. A través del análisis filogenético con las secuencias del *citb* asignó al menos dos especies (*C. othonopterus* y *C. reticulatus*) importantes en las pesquerías del Alto Golfo de California.

Estudios previos han demostrado que la combinación de análisis morfológicos y genéticos en la identificación de especies dan mayor robustez a las decisiones taxonómicas (Vázquez-Yeomans *et al.*, 2011; Tawa *et al.*, 2012, 2014; Díaz-Viloria *et al.* 2013). En estos estudios la identificación genética molecular ha tenido un impacto significativo en el campo de la taxonomía. Diversos proyectos como BOLD, MexBOL y FISH-BOL se han concentrado en la difusión de la utilización de COI del ADN mitocondrial, como una herramienta poderosa para la identificación molecular de las especies. Pineda-Santis *et al.* (2004) confirmaron la separación taxonómica de los géneros *Piaractus spp.* y *Colossoma spp.* propuestos por Machado Allison 1983 y Orti *et al.*, 1996, así como la discriminación entre especies del género *Brycon spp.* (*Brycon moorei* vs *Brycon henni*) en individuos provenientes del medio natural y de cultivo. Valdez-Moreno *et al.* (2010) demostraron el éxito de la identificación de peces marinos (huevos, larvas y adultos) de Yucatán, mediante el código de barras. Estos autores identificaron el 20% de huevos y el 98% de peces adultos de importancia comercial, también conectaron el 48% de las larvas con sus estadios adultos. Con base en esto propusieron que los códigos de barras de ADN serán una herramienta rutinaria tanto en la taxonomía como en la gestión de la pesca, particularmente en esfuerzos de protección zonas de desove y crianza de especies de importancia comercial.

9.3. Descripción de especies de Sciaenidae.

Una de las aproximaciones utilizadas para esclarecer la distinción taxonómica de las especies es la morfometría que estudia la variación de la forma y su covarianza con otras variables. La morfometría clásica combina la estadística multivariada que permite evaluar la variación entre las conformaciones morfométricas y facilitan la representación gráfica de los resultados. Para el presente trabajo el análisis discriminante no permitió la diferenciación de las cuatro especies utilizando seis variables morfométricas. Sin embargo, tres variables presentaron diferencias significativas entre las larvas de las cuatro especies. Aun así las proporciones de la mayoría de las larvas de las especies se superpusieron y su uso como caracteres taxonómicos diagnósticos fue limitado.

Morfometría

En el presente estudio se observó que las tallas de las larvas más pequeñas de cada uno de los estadios, fueron menores a las reportadas en las especies descritas por Ramírez-Sevilla *et al* (1986), Moser (1996) y Díaz-Viloria *et al.* (2013). Sin embargo, las larvas más grandes de cada uno de los estadios se encontraron dentro del intervalo de tallas ya reportadas en las especies de Sciaenidae (Tabla 18). Esto podría deberse a que las larvas reportadas en este trabajo se recolectaron en septiembre mientras que la mayoría de estas especies desovan durante los meses de febrero-mayo (Ríos-Medina, 2012; Erisman *et al.*, 2012), sugiriendo que quizás las condiciones durante septiembre no fueron apropiadas para el crecimiento de las larvas.

Las larvas de *Cynoscion reticulatus* fueron las más pequeñas con 1.3 mm de longitud notocordal. Esta talla contrasta con los resultados reportados por Díaz-Viloria *et al* (2013) para esta misma especie quienes reportaron una longitud notocordal mínima de 4.1 mm. La variación de longitud podría estar relacionada con el ambiente debido a la época del año en la que se recolectaron. En este estudio las larvas se recolectaron a finales de verano (septiembre) y en el trabajo de Díaz-Viloria *et al.* (2013), se recolectaron a inicios de primavera (marzo).

Tabla 18. Intervalos de tallas en milímetros de las etapas larvarias en las especies encontradas y otras especies de Sciaenidae descritas por diferentes autores.

Especies	Huevo	Larva vitelina	Preflexión	Flexión	Postflexión
<i>Micropogonias megalops</i>	-----	-----	1.8-2.6	2.7-3.9	4.0-6.9
<i>Cynoscion othonopterus</i>	-----	-----	1.5-3.4	-----	3.5-5.0
<i>Cynoscion reticulatus</i>	-----	-----	1.3-3.3	-----	-----
<i>Menticirrhus nasus</i>	-----	-----	1.4-3.4	-----	6.2-6.9
<i>Cheilotrema saturnum</i> ^M	0.80-0.86	1.5-2.4	2.4-4.2	4.4-5.5	5.5-14.0
<i>Genyonemus lineatus</i> ^M	0.79-0.92	1.8-3.0	3.0-4.9	5.3-6.6	6.5-16.2
<i>Menticirrhus undulatus</i> ^M	0.84-0.88	1.4-2.6	2.6-3.8	4.8-5.2	5.4-9.6
<i>Roncador stearnsi</i> ^M	0.66-0.76	1.9-2.3	2.5-4.2	5.1-5.8	6.6-12.8
<i>Seriphus politus</i> ^M	0.73-0.78	1.7-2.5	2.6-3.9	4.3-5.4	6.0-15.0
<i>Umbrina roncadore</i> ^M	0.74-0.80	1.7-2.2	2.2-2.9	3.8-4.4	6.2-12.7
<i>Cynoscion parvipinnis</i> ^R	0.72-0.92	1.4-2.1	2.2-2.7	-----	-----
<i>Totoaba macdonaldi</i> ^D	-----	-----	2.7-3.4	-----	-----
<i>Cynoscion reticulatus</i> ^D	-----	-----	4.1-5.0	-----	-----

^M, tallas reportadas por Moser (1996); ^R, tallas reportadas por Ramírez-Sevilla *et al.* (1986); ^D, tallas reportadas por Díaz-Viloria *et al.* (2013).

Micropogonias megalops fue la única especie con desarrollo larvario completo, mostró una disminución de LPA/LN durante su desarrollo. Estos resultados contrastan con los de Moser (1996) quien reportó que la proporción LPA/LN durante el desarrollo larval de siete especies de Sciaenidae se mantiene o aumenta ligeramente conforme avanza el desarrollo de las especies.

Por otra parte *Menticirrhus nasus* y *Cynoscion othonopterus* solo se encontraron en estadios de preflexión y postflexión. La proporción LPA/LN de ambas especies aumentó ligeramente conforme avanzó su desarrollo, estos resultados son similares a los reportados en las especies de Sciaenidae por Moser (1996). Las proporciones LPA/LN de *Cynoscion reticulatus* en preflexión fueron menores a las proporciones reportadas previamente por Díaz-Viloria *et al.* (2013).

Merística

El conteo de miómeros es una característica diagnóstica de valor taxonómico en la identificación de múltiples familias de peces. Las larvas de la familia Sciaenidae se caracterizan por el recuento de 25 a 26 miómeros. En el presente trabajo tres de las cuatro especies presentaron los 25 miómeros característicos de esta familia. Sin embargo, las larvas de *Micropogonias megalops* presentaron de 24 a 26 miómeros, estas variaciones se han observado en la familia Sciaenidae, como entre *Cynoscion parvipinnis* (23 miómeros, Ramírez-Sevilla et al. 1986) y *Genyonemus lineatus* (26 miómeros, Moser 1996), así como a nivel de especie como en *Seriphus politus* (24-25 miómeros, Moser 1996).

La talla de 1.76 mm de LN en la que comenzó la formación de las aletas medias (dorsal, anal y caudal) en el presente trabajo, fue consistente a lo establecido a nivel familia en los percoideos, no mayor a los 2 mm (Johnson, 1984). La formación y aparición de los elementos de las aletas dorsal, caudal y anal se observaron en larvas en estadio de flexión, similar a lo señalado por Fritzsche y Johnson (1980) quienes mencionaron que la formación de las aletas comienza frecuentemente con la aparición de los radios blandos de las aletas dorsal y anal, durante o justo antes de la flexión.

Patrón de pigmentación

Una de las características taxonómicas empleadas para la identificación de larvas a nivel específico es el patrón de pigmentación (Kendall et al., 1984). En algunos grupos la ubicación y el número de pigmentos son características taxonómicas diagnósticas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos pigmentos son muy generales y se comparten entre las especies por lo cual no siempre permiten la diferenciación completa.

La mayoría de las especies de Sciaenidae identificadas en el presente estudio se diferenciaron entre ellas por el patrón de pigmentación. Las larvas de *Cynoscion othonopterus* se diferenciaron de *Micropogonias megalops* y *Menticirrhus nasus* por la presencia de uno o dos pigmentos dorsales sobre los miómeros 15 y 16 (preflexión) o 19 (postflexión). El patrón de pigmentación de *Cynoscion othonopterus* en preflexión fue parecido al de *Cynoscion reticulatus* del presente estudio y al

reportado por Díaz Viloría *et al.* (2013) en la ausencia de pigmentos en la nuca y en los pigmentos dorsales. No obstante *Cynoscion othonopterus* en preflexión en este estudio difirió en los pigmentos dorsales de los primeros miómeros y postanales de *Cynoscion reticulatus* reportado por Díaz Viloría *et al.* (2013).

Menticirrhus nasus se diferenció de *Micropogonias megalops*, *Cynoscion reticulatus* y *Cynoscion othonopterus* por ser una larva muy pigmentada y por presentar una línea media lateral pigmentada sobre el notocordio.

Las larvas de *Micropogonias megalops* se diferenciaron de *Cynoscion othonopterus*, *Menticirrhus nasus* y *Cynoscion reticulatus* por la presencia de uno o dos pigmentos sobre la nuca y la ausencia de pigmentos dorsales (Tabla 19). Los patrones de pigmentación no solo se han implementado para la identificación de estadios larvarios (Jiménez-Rosenberg, 1998), también se han empleado en la distinción de huevos (Richards, 2006).

Tabla 19. Características diagnosticas (pigmentación) de las larvas de Sciaenidae reportadas en este estudio.

	<i>Micropogonias megalops</i>	<i>Cynoscion othonopterus</i>	<i>Menticirrhus nasus</i>	<i>Cynoscion reticulatus</i>
cabeza	Grande y abultada.	Grande y abultada.	Grande y abultada.	Grande y abultada.
Número de miómeros	24-26	25	25	25
Pigmentos en la Nuca	Uno o dos (preflexión y flexión) ausencia (postflexión).	Sin pigmentos.	Más de dos.	Sin pigmentos.
Pigmentos dorsales	Sin presencia.	Uno sobre el primer miómero y Uno o dos sobre los miómeros 15 y 16 (preflexión). Un pigmento en el miómero 19 (postflexión).	De 11 a 27 sobre la cola.	Uno o dos sobre los primeros miómeros de la notocorda y uno en la parte posterior de la notocorda.
Pigmentos preanales.	Dos a siete pigmentos.	Cuatro a seis pigmentos.	10 a 38 pigmentos.	Cuatro a diez pigmentos.
Pigmentos postanales.	10 a 17 dispuestos entre los miómeros 19 y 23. Dos de ellos estrellados entre los miómeros 16 y 17.	12 a 20 pigmentos.	Más de 30 pigmentos, dispuestos entre los miómeros.	Cuatro a 20 pigmentos.

9.4. Distribución

La distribución de las especies cuyas larvas fueron identificadas en este estudio está establecida desde la boca del Golfo de California hasta el Alto Golfo de California, con excepción de *Cynoscion reticulatus* que se encuentra reportada desde el norte de Perú hasta el sur del Golfo de California (Fisher *et al.*, 1995). Sin embargo, en el presente trabajo se encontró hasta el Alto Golfo de California en la zona de amortiguamiento, ampliando su intervalo de distribución. La identificación de larvas de *C. reticulatus* en el AGC concuerda por lo reportado por Díaz-Viloria *et al* (2013).

Las larvas de las cuatro especies se encontraron en la zona de amortiguamiento del AGC, lo que podría indicar una zona de desove de estas especies. Además las larvas de *Micropogonias megalops* y *Cynoscion othonopterus* se encontraron en una estación en la zona núcleo. Esto coincide con las migraciones anuales de *Cynoscion othonopterus* al Delta del Rio Colorado, como zona de desove (Erisman *et al* 2012).

Sánchez-Velasco *et al.* (2012) diferenciaron tres hábitats larvarios (Frente, Mezcla, Plataforma) en el AGC mediante factores físicos y composición de especies. Las larvas de las cuatro especies de Sciaenidae del presente estudio se encontraron en su mayoría en los hábitats Mezcla y Frente.

10. CONCLUSIONES

- 1.- El presente trabajo aportó información sobre la descripción de los estadios tempranos de cuatro especies de Sciaenidae, así como la presencia de desoves de estas especies durante el mes de septiembre en el AGC.
- 2.- Las proporciones morfométricas y caracteres merísticos no discriminaron entre las especies encontradas en este estudio en estadio de preflexión. Sin embargo el patrón de pigmentación permitió la diferenciación clara de dos de ellas (*Menticirrhus nasus* y *Micropogonias megalops*).
- 3.- Mediante las fracciones COI y 16S del ADNmt se diferenciaron a cada una de las especies reportadas en el presente trabajo.
- 4.- Genéticamente los morfotipos 1 (*Cynoscion othonopterus*), 4 (*Menticirrhus nasus*) y 2 (*Cynoscion reticulatus*) en preflexión fueron especies diferentes. El morfotipo 3 y morfotipo 2 en estadios de flexión y postflexión fueron la misma especie (*Micropogonias megalops*).
- 5.- Las larvas de *Cynoscion reticulatus* fueron las más abundantes, lo que sugiere que esta especie también desova en el AGC durante este mes. Por otra parte, las larvas de *Menticirrhus nasus* fueron las de mayor presencia en las estaciones de muestreo, lo que sugiere que los adultos de esta especie desovan en la mayoría del área del AGC.
- 6.- Las descripciones realizadas en el presente estudio, generan la posibilidad de desarrollar estudios ecológicos de *Micropogonias megalops*, *Menticirrhus nasus* y *Cynoscion othonopterus* (postflexión) y sugieren el uso de marcadores moleculares en el caso de las larvas en preflexión de *C. othonopterus* y *C. reticulatus*.

11. RECOMENDACIONES

Como se sabe, la identificación taxonómica de estadios tempranos de peces no es sencilla por factores como: la falta de descripciones previas, falta de características distintivas y los cambios que presentan durante su desarrollo.

1.- Para evitar la subestimación o sobreestimación de especies de Sciaenidae identificadas a nivel de morfotipo, se recomienda que se le asigne el estadio, por ejemplo: morfotipo 2-preflexión, morfotipo 2-flexión, etc.

2.- Por otra parte es necesario que se continúen realizando estudios genéticos y morfológicos, para la identificación del de los morfotipos de familia Sciaenidae faltantes y de otras familias que se encuentran en la zona del Alto Golfo.

3.- Además se recomienda que se realicen estudios con muestreos estratificados para obtener morfotipos adicionales de Sciaenidae reportados en el AGC y poder identificarlos a nivel especie.

4.- Se recomienda utilizar otras técnicas (transparentación y tinción de especímenes, otolitos, desarrollo larval en cautiverio, etc.) que permitan obtener características distintivas que ayuden en la identificación de especies de los estadios larvarios de Sciaenidae.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Avise, J.C. 2001. *Phylogeography: The History and formation of species*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA. 447 p.
- Barbosa, A.J.B., I. Sampaio, H. Schneider & S. Santos. 2014. Molecular phylogeny of weakfish species of the *Stellifer* group (Sciaenidae, Perciformes) of the Western South Atlantic based on mitochondrial and nuclear data. *PLoS ONE* 9(7): e102250. doi:10.1371/journal.pone.0102250
- Brogan, M.W. 1994. Distribution and retention of larval fishes near reefs in the Gulf of California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, (115):1-13.
- Chao, N.L. En Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter & V. H. Niem. 1995. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental*. Vol. III. Vertebrados Parte 2. 1201-1813p.
- Dawnay, N., R. Ogden, R. McEwing & G. R. Carvalho. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.* 173: 1-6.
- Díaz-Viloria, N., L. Sánchez-Velasco, R. Pérez-Enríquez & S.P.A. Jiménez-Rosenberg. 2013. Molecular identification and morphological description of *Totoaba macdonaldi* and curvina *Cynoscion reticulatus* preflexion larvae (Perciformes: Sciaenidae). *Ichthyol. Res.* 60(4), 390-395.
- Erisman, B. O. Aburto-Oropeza, C. González-Abraham, I. Mascareñas-Osorio, M. Moreno-Báez & P. A. Hastings. 2012. Spatio-temporal dynamics of a fish spawning aggregation and its fishery in the Gulf of California. *Scientific Reports.* 2:284.
- Flores-Coto, C., P. Figueroa-Páez & F. Zavala-García. 1999. Distribución y abundancia de larvas de Sciaenidae en la columna de agua, en el sur del Golfo de México. *Hidrobiológica* 9 (2): 135-144.
- Fritzsche, R.A. & D.G. Johnson. 1980. Early osteological development of white perch and striped bass with emphasis on identification of their larvae. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 387-406.

- Hallden, C., N. O. Nilsson, I.N. Rading & T. Sall. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 88, 123–128.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasinghan & J.R. deWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *P. Roy. Soc. Lond. B- Bio.* 270 (Suppl.), S96-S99.
- Heiden-Van der. 1985. Taxonomía, biología y evaluación de la ictiofauna demersal del Golfo de California, Cap. 4:149-200 En: Yañez-Arancibia, A (Ed.) Recursos pesqueros potenciales de México: La pesca acompañante del camarón. Progr. Univ. de Alimentos, Inst. Cienc. Del Mar y Limnol., Inst.Nal. de Pesca UNAM, México D.F. 748 p.
- Houden E.D. 2001. Fish Larvae. University of Maryland, Solomons, MD, USA. *Academic Press.* 928-938 p.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N.E. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April & L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE* 3, e2490–2490.
- Hyde, J.R., E. Lynn, R. Humphreys, M. Jr. Musyl, A.P. West & R. Vetter. 2005. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlín, shortbill spearfish, and wahoo. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286:269-277.
- Ivanova, V.N., S.T. Zemlak, H.R. Hanner & D.N.P. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes.*7: 544-548.
- Jiménez-Rosenberg, S.P.A. 1998. *Descripción del desarrollo larvario de Eucinostomus gracilis y larvario y juvenil de Eucinostomus dowii y Diapterus peruvianus.* Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, 107 p.
- Jiménez-Rosenberg, S.P.A., L. Sánchez-Velasco, F. Ordoñez & F.M. Lavín. 2012. Identification of fish larvae from the Upper Gulf of California: Cruise GOLCA-1006 (June 1-9, 2010) Informe Técnico 103574. Departamento de Oceanografía Física CICESE. 38 p.

- Johnson, G.D. 1984. Percoidei: Development and relationships. pp. 464-498. En: Moser, H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Jr. Kendall & S.L. Richardson. (eds.). *Ontogeny and systematics of fishes. Am. Assoc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub. 1.*
- Kendall, A.W.Jr., E.H. Ahlstrom & H.G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. p. 1 I-23. En: Moser, H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W.Jr. Kendall & S.L. Richardson. (eds.). *Ontogeny and systematics of fishes. Am. Assoc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub. 1*
- Kendall, A.W.Jr. & A.C. Matarese. 1994. Status of early life history descriptions of marine teleosts. *Fish. Bull.* 92 (4): 725-736.
- Kimura, M. 1980a. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Lakra, W.S., M. Goswami & A. Gopalakrishna. 2009. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) based on 16SrRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Mol. Biol Rep.* 36:831-839.
- Lane, N. 2009. On the origin of bar codes. *Nature*, Vol. 462: 19.
- Lavín, M.F. & S.G. Marinone. 2003. An over view of the Physical Oceanography of the Gulf of California. En: Velasco-Fuentes, O.U., J. Sheinbaum & J.L. Ochoa de la Torre. (Eds.), *Nonlinear processes in geophysical fluid dynamics.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, la Netherlands, pp.173–204.
- Lopera-Barrero, N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo & T. da Silva-López. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.* 35(1): 77-86.
- Moser, H.G. 1996. *The early stages of the fishes in the California Current region. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigation Atlas No. 33.* Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas.
- Moser, H.G. & G.W. Boehlert. 1991. Ecology of pelagic larvae and juveniles of the genus *Sebastes*. *Environ Biol Fish* 30: 203–224.

- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York (333 p.).
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Ordóñez-Guillén, F.E. 2014. *Hábitats de larvas de peces en el Alto Golfo de California en dos épocas climáticas junio 2010 y marzo 2011*. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. 83 p.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics* (eds Hillis DM, Moritz C, Mable BK), pp. 205–247. Sinauer & Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Pegg, G.P., B. Sinclair, L. Briskey & J.W. Aspden. 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Sci. Mar.* 70S2.
- Pineda-Santis, H.R., D. Pareja-Molina, M. Olivera-Ángel & J. Builes-Gómez. 2004. Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17:30-37.
- Ramírez-Sevilla, R.E., Matus-Nivón & R. Martínez-Pecero. 1986. Descripción del huevo y larva temprana de *Cynoscion parvipinnis* Ayres (Pisces: Sciaenidae). *Inv. Mar. CICIMAR* 3:39-51.
- Richards, W.J. (ed.) 2006. Early Stages of Atlantic Fishes. An Identification Guide for the Western Central North Atlantic. Vol. I y II. CRC Taylor & Francis, New York, USA. 2,640 p.
- Richardson, D.E., D.J. Vanwye., M.A. Exum., K.R. Cowen & L.D. Crawford. 2007. High throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics. *Molecular Ecology Notes* 7, 199-207.
- Ríos-Medina, K. 2012. *Diversidad genética de la corvina golfina (Cynoscion othonopterus) en la Reserva de la Biosfera del Alto Golfo de California y Delta*

- del Río Colorado*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 118 p.
- Román Rodríguez, M.J. 2000. Estudio poblacional del chano norteño, *Micropogonias megalops* y la corvina golfina *Cynoscion othonopterus* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae), especies endémicas del Alto Golfo de California, México. Instituto del Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L298. México D.F.
- Sánchez-Velasco, L., S.P.A. Jiménez-Rosenberg, A. Sánchez-Uvera, M.F. Lavín & M. del R. Pacheco-Chávez. 2011. Fish larvae from the Upper Gulf of California: Cruise GOLCA-0806 (June 2–17, 2008). Informe Técnico 100281. Departamento de Oceanografía Física, CICESE, Ensenada, México.
- Sánchez-Velasco, L., M.F. Lavín, S.P.A. Jiménez-Rosenberg, J.M. Morales & Turk-P.J. Boyer. 2012. Larval fish habitats and hydrography in the Biosphere Reserve of the Upper Gulf of California (June 2008) *Shelf. Res.* (33) 89-99.
- Santana, M.O., G.J.L. Castillo, O. Sosa-Nishizaki & M.C. Rodríguez. 2004. Catálogo de tiburones, rayas y quimeras (chondrichthyes) que habitan en las aguas del norte del Golfo de California. Ensenada, México: CICESE.
- Selvamani, M.J.P., S.M. Degnan & B. M. Degnan. 2001. Microsatellite Genotyping of Individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 3, 478–485.
- Smith, P.E. & S.L. Richardson. 1977: Standard techniques for pelagic fish egg and larva surveys. FAO Tech. Paper No. 175, 100 pp.
- Stanwell-Smith, D.S., L. Peck, A. Clarke, W.A. Alistair-Murray & C.D. Todd. 1999. The distribution, abundance and seasonality of pelagic marine invertebrate larvae in the maritime Antarctic. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 1999 354, 471-484.
- Steinke, D., T.S. Zemlak, J.A. Boutillier & P.D.N. Hebert. 2009a. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar. Biol.* 156, 2641–2647.
- Strauss, R.E. & C.E. Bond. 1990. Taxonomic methods: Morphology. pp.: 109-140. En: *Methods for fish biology*. C.B. Schreck & P.B. Moyle (eds.). American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, U.S.A. 684 pp.

- Tamura, K., J. Dudley., M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tawa A., M. Kobayakawa., T. Yoshimura & N. Mochioka. 2012. Identification of leptocephalus larvae of the tiger moray *Scuticaria tigrina* (Anguilliformes; Muraenidae) based on morphometric and genetic evidence. *Ichthyol. Res.* 12-292.
- Tawa A., J. Aoyama., T. Yoshimura, S. Wouthuyzen & N. Mochioka. 2014. Leptocephalus larvae of two moray eels (Anguilliformes; Muraenidae), *Gymnothorax sagmacephalus* and *Gymnothorax albimarginatus*, identified from morphometric and genetic evidence. *Ichthyol. Res.* 61:32–41.
- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish. Biol. Fisheries.* 19:265–293.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994, Vol.22.
- Valdez-Moreno, M., L. Vásquez-Yeomans, M. Elías-Gutiérrez, N.V. Ivanova & P.D.N. Hebert. 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.
- Vásquez-Yeomans, L., L. Carrillo, S. Morales, E. Malca, Jr. J.A. Morris, T. Schultz & J.T. Lamkin. 2011. First larval record of *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) collected from the ichthyoplankton in the Atlantic. *Biol Invasions.* 13:2635–2640.
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last & P.D.N Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci* 360: 1847-1857.