



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

Identificación molecular de especies crípticas de *Mugil curema*

(Pisces: Mugilidae) en las costas de México.

TESIS

Que para obtener el grado de

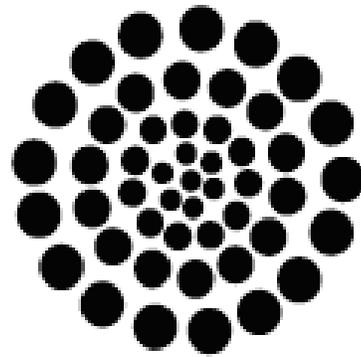
Maestra en Biología

PRESENTA:

CONCEPCIÓN LIZETTE ÁVILA HERRERA

Directora: Ana Laura Ibáñez Aguirre

Ciudad de México, 2017



CONACYT

La maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al
Padrón de Posgrados de Calidad del CONACYT

El presente trabajo se realizó gracias a la beca otorgada por el CONACYT durante el
periodo 2015 a 2017

Número de registro: 717623

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

Concepción Lizette Ávila Herrera

El día 29 de Noviembre del año 2017

Comité Tutorial y Jurado

Directora: Ana Laura Ibáñez Aguirre

Asesora: Alejandra Serrato Díaz (Secretaria)

Asesor: Luis Manuel Guevara Chumacero (Presidente)

Sinodal: Jhoana Díaz Larrea (Vocal)

Sinodal: Héctor Espinosa Pérez (Vocal)

La presente investigación se realizó en:

En la Planta Experimental de Producción Acuícola (PEXPA) de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa bajo la dirección de la

Dra. Ana Laura Ibáñez Aguirre

El Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa bajo la coordinación de la

Dra. Alejandra Serrato Díaz.

DEDICATORIA

Para mi amor apache Don Cirino, mi eterna inspiración...

Abuelito cada día estoy más cerca de la meta, sé que en esta vida terrenal no podrás leer esto, pero quiero y necesito creer que algún día nos volveremos a encontrar, entonces nos reiremos y amaremos como antes, por el momento me consuela saber que estoy cumpliendo con lo prometido

¡Te amo!

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a mi casa siempre abierta al tiempo Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAMI) por abrirme las puertas al conocimiento desde la licenciatura.

A la Dra. Ana Laura Ibáñez Aguirre, mi directora de tesis, por permitirme ser su alumna, quiero que sepa que valoro enormemente el tiempo que ha dedicado a la corrección de este escrito, su paciencia y buenos consejos, me llevo un gran ejemplo de lo que una buena investigadora debe llegar a ser.

A la Dra. Alejandra Serrato Díaz, mi querida asesora, no hay palabras para describir la increíble experiencia de conocerte, más allá de tu apoyo en el laboratorio y el trabajo escrito, quiero agradecerte tus palabras de aliento cuando llegue a sentirme incapaz siempre abrazaron mi alma, gracias por estar en los buenos y malos momentos.

Al Dr. Luis Manuel Guevara Chumacero, mi asesor, quien desde el primer día que le conocí su impresionante pasión por la biología me motivo para lograr los objetivos de esta tesis, gracias por siempre tener una buena actitud, amabilidad y dinamismo.

A la Dra. Jhoana Díaz Larrea, por su incondicional apoyo en la elaboración de los resultados, fueron muchas horas de trabajo pero han valido la pena, gracias por compartir tanto conocimiento conmigo y por creer en mí, sin usted no lo habría logrado.

A la Dra. Eloisa Pacheco Almanzar, por su ayuda en el laboratorio, por facilitarme información indispensable para la comprensión de la biología de *Mugil curema*, por los buenos momentos compartidos muchas gracias.

A mi querido compañero de vida mi amado esposo José Luis Salazar Frausto, gracias por darme fuerzas todas las veces que he llegado derrotada y sin ganas de nada, por creer en mí cuando yo misma no lo hago, tus palabras hacen que quiera llegar a ser una gran investigadora y cada día confirme más mi llamado a este mundo apasionante de la biología ¡Te amo!

A mis padres por todo el apoyo emocional, gracias por sus oraciones y su constante preocupación por mi salud espiritual. Sus brazos siempre han sido el lugar perfecto donde mi alma descansa después de un arduo trabajo. Su casa el único lugar en donde yo me siento libre de las presiones cotidianas de mi vida académica y profesional. Simplemente gracias por ser mis padres y por convertirme en la persona que ahora soy.

A mi hermano Miguel, para el cual cada día quiero ser un mejor ejemplo de vida, quiero que veas que no es difícil llegar hasta donde estoy, espero algún día compartir contigo la misma felicidad de un logro profesional.

A mi hermana Lilian, gracias por amarme tanto, tu compañía, consejos y apapachos han sido el mejor escape a mis preocupaciones producidas durante la elaboración de este trabajo, te amo mucho.

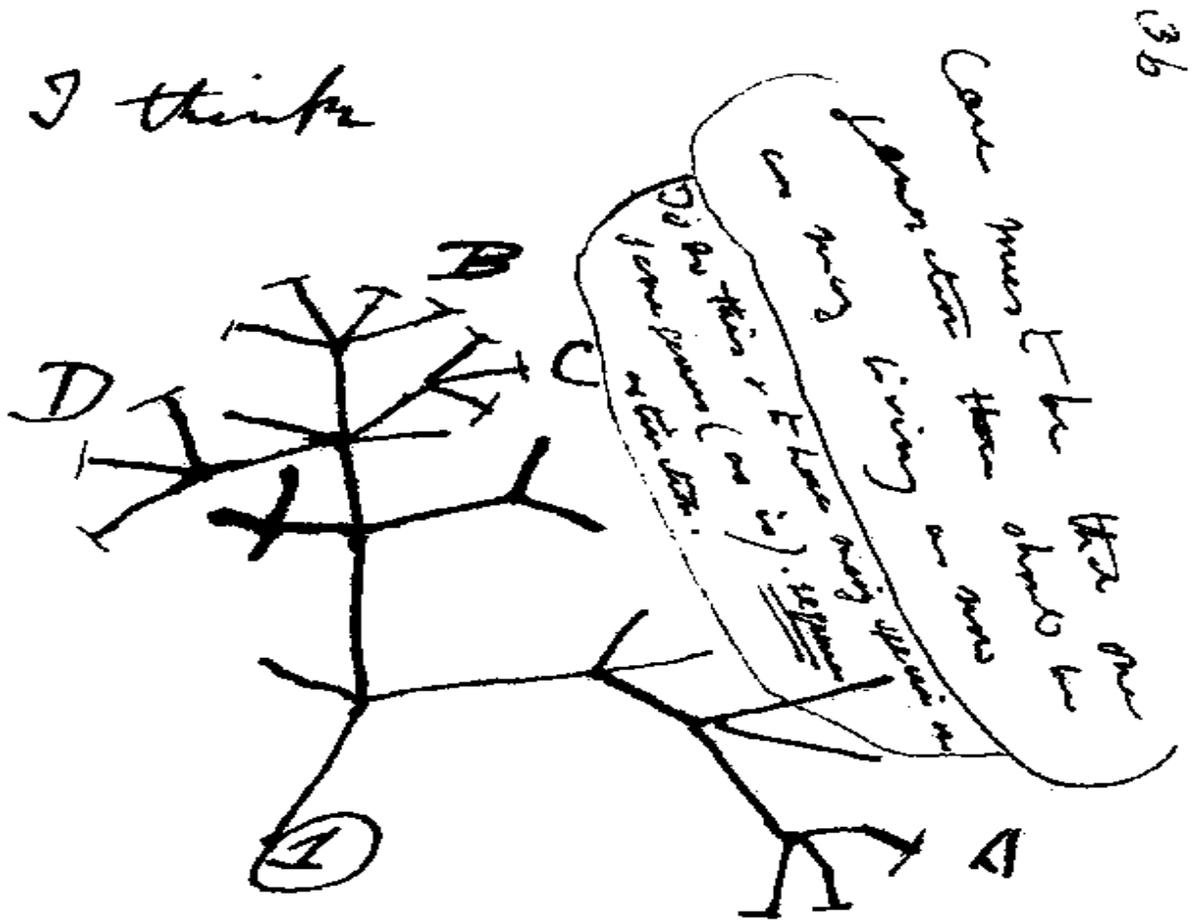
A mi unnie Myri, gracias loca canelus por estar en mi vida, por mostrarme el valor de una verdadera amistad, por los consejos y estar siempre pendiente de mí trabajo de tesis.

A Zanni Hernández Pérez, por los momentos de risas, preocupación y corajes que compartimos durante la maestría, gracias por ser una gran compañera.

A mis compañeros del Laboratorio Divisional de Biología Molecular, por sus consejos, críticas y comentarios que me ayudaron a crecer académicamente y profesionalmente. Yanin, Ángeles, Karen, Aline, Víctor, Memo, Daf y Angie.

A diferentes personas que colaboraron en la recolecta de muestras, en el primer y segundo años a Eloísa Pacheco-Almanzar y a Ana Laura Ibáñez. Adicionalmente, otras colectas fueron realizadas por diversos colaboradores. Juan Carlos Pérez Jiménez de Ecosur Campeche, Camps., colector de las muestras de Sabancuy. A Xavier Chiappa, Maribel Badillo, Fernando Mex y Alfredo Gallardo de la UNAM, Unidad Académica Sisal, por su ayuda en la colecta de ejemplares de Sisal. A Elaine Espino Barr y a Esther Cabral Solís del CRIP-Manzanillo, por su ayuda en la colecta de ejemplares de la laguna de Cuyutlán, Col. A Pedro Cervantes de la Universidad del Mar de Oaxaca por su ayuda en la colecta de ejemplares del Sistema Lagunar Huave de Oaxaca. A Mathew Watkins del FWC Fisheries-Independent Monitoring Staff en la Universidad de Jacksonville, FWRI Field Lab. Por la colecta y envió de ejemplares de Jacksonville, Florida. A Norman Boyd del Texas Parksand Wildlife Department, USA

(líder del ecosistema de San Antonio Bay) y especialmente a James Simons (A&M Texas University) quienes recolectaron las muestras de *Mugil curema* en Texas.



Hay grandeza en esta concepción de la vida,... que mientras este planeta ha ido girando según la constante ley de la gravitación, se han desarrollado y se están desarrollando, a partir de un comienzo tan sencillo, ininidad de formas cada vez más bellas y maravillosas.

Charles Darwin

ÍNDICE

Índice de figuras	11
Índice de tablas	12
Resumen	13
Abstract.....	15
I. Introducción	17
1.1 Las costas de México.....	17
1.2 Biología y sistemática de <i>Mugil curema</i>	19
1.3 Definición de especies crípticas.....	23
1.4 Importancia de los Marcadores moleculares para la correcta identificación de especies crípticas.....	24
1.5 Citocromo oxidasa I (COI).....	25
II. Antecedentes	26
III. Justificación	29
IV. Pregunta de Investigación	30
V. Hipótesis	30
VI. Objetivos	30
6.1 General.....	30
6.2 Específicos.....	30
VII. Material y métodos	31
7.1.1 Muestreo.....	31
7.1.2 Extracción de ADN.....	33
7.1.3 Amplificación.....	34
7.1.4 Secuenciación.....	35
7.1.5 Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas.....	36
7.1.6 Construcción de redes haplotípicas.....	36
7.1.7 Estructura genética poblacional.....	37
7.1.8 Selección del modelo evolutivo.....	37

7.1.9 Relaciones filogenéticas intraespecíficas.....	38
7.2 Análisis de distancia genética	39
7.2.1 Tiempos de divergencia.....	40
VIII. Resultados	41
8.1 ADN y amplicones.....	41
8.2 Secuencias nucleotídicas.....	41
8.3 Red Haplotípica.....	42
8.4 Estructuración genética.....	47
8.5 Reconstrucciones filogenéticas.....	48
8.6 Distancia genética.....	51
8.7 Tiempos de divergencia.....	52
IX. Discusión	53
9.1 Comparación de métodos y resultados con análisis moleculares previos de <i>Mugil curema</i>	53
9.2 Diferenciación genética del Golfo de México vs. Pacífico mexicano.....	56
9.3 Estructura genética poblacional en el Golfo de México.....	58
9.4 Estructura genética poblacional en el Pacífico mexicano.....	62
X. Conclusiones	68
XI. Perspectivas	70
XII. Literatura Citada	71
XIII. Anexos	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Zonas de colecta de *Mugil curema* del 2009-2015.

Fig. 2. Esquema representativo del fragmento amplificado del gen citocromo oxidasa I, en color rojo.

Fig. 3. Electroforesis de un fragmento de aproximadamente 700 pb del gen COI. En el primer carril se observan las bandas de referencia del marcador estándar de alto peso molecular (50-2000 pb) (λ), en los carriles resultantes (A-I) se observan las muestras amplificadas.

Fig. 4. Electroferograma de un fragmento del gen COI de *Mugil curema*.

Fig. 5. Red haplotípica ilustrando la presencia de los dos haplogrupos de *Mugil curema* formados a partir de las secuencias de COI. Las líneas que conectan cada haplotipo indican los pasos mutacionales entre ellos. Los pequeños círculos blancos indican haplotipos hipotéticos y los diferentes tamaños de los círculos la frecuencia haplotípica. Los colores representan la correspondencia geográfica de los haplotipos.

Fig. 6. Mapa de haplotipos para *Mugil curema*, a lo largo de su distribución. El círculo representa a la población muestreada y en la parte inferior se muestra los códigos de color para cada haplotipo.

Fig. 7. Reconstrucción filogenética Bayesiana de los 17 haplotipos del gen COI para *Mugil curema*. Los valores de soporte en las ramas indican: arriba (Bootstrap NJ/ Bootstrap MP); abajo (Bootstrap MV/ Probabilidad Posterior Bayesiana). IC= 68, IR= 78. Los colores indican los tres linajes con su correspondencia geográfica.

Fig. 8. Frecuencia de la serie lateral de escamas de localidades del GM y PM. Tomado de Ibáñez (en preparación).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desove de *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) en el Golfo de México.

Tabla 2. Desove de *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) en el Pacífico mexicano.

Tabla 3. Estudios moleculares donde se reconoce la presencia de especies crípticas en *Mugil curema* a lo largo de su distribución geográfica.

Tabla 4. Características y tamaño de muestra. Se indica la localidad con su acronimia, las coordenadas geográficas (Lat=latitud, Long=longitud), tamaño de muestra (n) y el año de colecta. GM = Golfo de México; PM = Pacífico mexicano.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos del gen COI.

Tabla 6. Lista de haplotipos encontrados (H). Se indica el número de Individuos (NI) que comparten un mismo haplotipo, el porcentaje (%) correspondiente a los 125 individuos analizados y el código de cada muestra (CM).

Tabla 7. Resultados del AMOVA para el total de las localidades.

Tabla 8. Resultados del AMOVA para las localidades del Golfo de México.

Tabla 9. Resultados del AMOVA para las localidades del Pacífico mexicano.

Tabla 10. Porcentaje de distancia media entre las catorce localidades.

Tabla 11. Porcentaje de distancia media entre los 17 haplotipos para el gen COI.

RESUMEN

Las diferencias morfométricas y la diferenciación en las temporadas de desove que muestra *Mugil curema* en diferentes localidades de las costas mexicanas, más las variaciones en el ambiente y las corrientes oceanográficas, pueden dar paso a la formación de especies crípticas debido a una posible reducción del flujo génico. Una reciente revisión filogenética mitocondrial reportó cuatro linajes crípticos de *Mugil curema* a lo largo de su distribución geográfica: 1) en costas del Pacífico este (O), 2) occidente del Atlántico (T2), 3) Venezuela (N) y 4) costa occidental de África (M). En este estudio se presenta el primer análisis intraespecífico de *M. curema* en las costas de México con el objetivo de detectar especiación críptica dentro y entre las localidades del Golfo de México (GM) y Pacífico mexicano (PM) para lo cual se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), se obtuvieron distancias genéticas, una red de haplotipos, se infirieron relaciones filogenéticas intraespecíficas, y se calcularon tiempos de divergencia. Se analizaron 125 secuencias mitocondriales de un fragmento de 626 pb del gen citocromo oxidasa I (COI) de catorce localidades, diez del GM, una del Atlántico y tres del PM. Los análisis de AMOVA, redes haplotípicas, distancias genéticas y relaciones filogenéticas sugieren la presencia de dos haplogrupos, uno en GM (correspondiente al linaje T2 considerado el verdadero linaje de *Mugil curema*) y la localidad de Oaxaca, y otro en la vertiente del Pacífico (con excepción de Oaxaca), que podrían representar dos especies crípticas. La separación de estos haplogrupos data de hace 1.5 ma coincidiendo con el cierre del Istmo de Panamá. Con base en los análisis mencionados, el haplogrupo de PM muestra a su vez una subdivisión en un grupo norte y un grupo sur, con separación hace 0.4 ma que podría ser resultado de

una combinación de factores y cambios oceanográficos del Pleistoceno posteriores al cierre del Istmo de Panamá. La presencia de Oaxaca dentro del linaje del GM puede deberse a una conexión pasada o reciente en el Istmo de Tehuantepec por medio de las inundaciones de las subcuencas o a que los individuos de esta localidad conservan polimorfismos ancestrales del linaje basal del GM.

ABSTRACT

The morphometric differences and the differentiation in the spawning seasons shown by *Mugil curema* in different localities of the Mexican coasts, plus the variations in the environment and the oceanographic currents, can give way to the formation of cryptic species due to a possible reduction of the flow gene. A recent mitochondrial phylogenetic review reported four cryptic lineages of *Mugil curema* throughout its geographical distribution: 1) on the eastern Pacific (O), 2) western Atlantic (T2), 3) Venezuela (N), and 4) coast Western Africa (M). This study presents the first intraspecific analysis of *M. curema* in the coasts of Mexico with the objective of detecting cryptic speciation within and between the localities of the Gulf of Mexico (GM) and the Mexican Pacific (MP) for which an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed, genetic distances were obtained, a network of haplotypes, intraspecific phylogenetic relationships were inferred, and divergence times were calculated. We analyzed 125 mitochondrial sequences from a 626 bp fragment of the cytochrome oxidase I (COI) gene from fourteen locations, ten from the GM, one from the Atlantic and three from the PM. The analyzes of AMOVA, haplotypic networks, genetic distances and phylogenetic relationships suggest the presence of two haplogroups, one in GM (corresponding to the T2 lineage considered the true lineage of *Mugil curema*) and the locality of Oaxaca, and another in the Pacific slope (with the exception of Oaxaca), which could represent two cryptic species. The separation of these haplogroups dates from 1.5 ma coinciding with the closure of the Isthmus of Panama. Based on the above analyzes, the PM haplogroup shows a subdivision into a northern group and a southern group, separated by 0.4 ma, which could be the result of a

combination of factors and oceanographic changes of the Pleistocene after the closure of the Isthmus from Panama. The presence of Oaxaca within the GM lineage may be due to a past or a recent connection in the Isthmus of Tehuantepec by means of the flooding of sub-basins or because individuals of this locality maintain ancestral polymorphisms of the GM basal lineage.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Las costas de México

Hace 160 a 140 millones de años (ma) aproximadamente comenzó la formación del Golfo de México, con el movimiento de los bloques de Yucatán al sur y Bahamas de la Florida al sureste, formando una cuenca amplia y profunda conectada con el Océano Pacífico oeste actualmente en el Golfo de Tehuantepec (Oaxaca) y el Norte de Chiapas, el protocaribe, el Océano Atlántico del sur y este (Salvador, 1991).

Entre los sistemas costeros del Golfo de México y Pacífico mexicano se han reportado especies crípticas de peces, por ejemplo, *Girella nigricans* y *Albula vulpes* (Terry *et al.*, 2000; Colborn *et al.*, 2001) la formación de estas especies podría ser causada por la evolución geológica, el aislamiento geográfico, las diferentes condiciones ambientales y oceanográficas entre estas costas (Lara-Lara *et al.*, 2008).

Entre el Pacífico mexicano y el Golfo de México la fauna marina era muy similar debido a su conexión (Salvador, 1991). Existen evidencias en la región del Caribe de organismos fósiles marinos del Oligoceno, Mioceno y Plioceno similares a los actuales y relativamente cercanos a algunos especímenes del Atlántico Norte, Centro, Sur y Pacífico mexicano, lo cual refleja la gran interacción que hubo entre dichas aguas oceánicas (Prothero *et al.*, 2003; Iturralde-Vinent, 2004).

La comunicación entre el Golfo de México y el Océano Pacífico se interrumpió con la formación del Istmo de Panamá hace 7-2.8 ma lo que condujo a la formación de nuevas especies de peces (Coates *et al.*, 2005; Montes *et al.*, 2012). Posterior a este evento

Beu (2001) y Bacon *et al.* (2015) comprobaron con evidencia fósil y molecular que se mantuvo un intercambio de larvas de fauna marina entre el Pacífico y el Atlántico debido al aumento del nivel del mar producto de las glaciaciones del Pleistoceno que terminó aproximadamente hace 1.03-0.7 ma. Estos eventos pudieron haber sido los causantes de la formación de especies crípticas morfológicamente idénticas pero aisladas reproductivamente y molecularmente divergentes unas de las otras (Brand, 1989; Medlin, 1995; Pierrot-Bults, 1995).

Actualmente las diferencias entre las dos costas mexicanas son muy marcadas, el Pacífico se considera una costa de colisión, debido a los movimientos entre la placa americana y la de Cocos, mientras que el Golfo de México se ubica como una costa de mares marginales, exceptuando la península de Yucatán la cual discrepa del resto del Golfo de México por ser una plataforma que se origina en la depositación de carbonatos y que posteriormente emerge (Inman & Nordstrom, 1971).

El Golfo de México se divide en dos zonas biogeográficas, el Golfo de México Norte que incluye las zonas costeras del este de Florida, Alabama, Misisipi, Luisiana, Texas, hasta el norte del río Panuco en Tamaulipas y la región del Golfo de México sur que abarca las aguas enfrente de los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán, así como la parte profunda del talud frente a Florida y al abanico del Misisipi (Wilkinson *et al.*, 2009). En ambas zonas existe una gran diversidad de ambientes debido al sistema de corrientes, el patrón de los vientos (giros ciclónicos y anticiclónicos), la temperatura, salinidad y precipitación. Estos factores son parcialmente responsables de la distribución espacial de los organismos. La corriente más importante del Golfo

de México es la de Lazo la cual penetra por el canal de Yucatán y sale por los estrechos de Florida para convertirse en la corriente de Florida y posteriormente en la corriente del Golfo por medio del desprendimiento de un gran giro anticiclónico, además existen zonas de circulación ciclónica al norte de la plataforma de Texas-Luisiana, al oeste de la plataforma de Florida y en la bahía de Campeche (Monreal-Gómez *et al.*, 2004).

El Pacífico mexicano se divide en dos zonas biogeográficas, el Pacífico transicional mexicano (PTM) que va desde Baja California Sur hasta Punta Maldonado que limita con Oaxaca y el Pacífico centroamericano (PC) que comprende el Golfo de Tehuantepec y Chiapas (Wilkinson *et al.*, 2009). Ambas regiones tienen una amplia diversidad de ambientes costeros que albergan una importante riqueza específica. Las corrientes principales de estas dos áreas son la corriente norecuatorial (CNE), la corriente costera de Costa Rica (CCR) y la corriente de California (CC). La (CCR) solo llega hasta el Golfo de Tehuantepec y retorna hacia el sur por un flujo anticiclónico que alimenta a la (CNE) (Kessler, 2006).

1.2 Biología y sistemática de *Mugil curema*

Mugil curema (Valenciennes, 1836) es una especie de pez conocida como liseta, lebrancha o lisa blanca, pertenece a la Clase Actinopterygii; al Orden Mugiliformes y la Familia Mugilidae. Morfológicamente se caracteriza por presentar 4 espinas en la primera aleta dorsal, de 9 a 10 rayos blandos en la segunda dorsal, 3 espinas en la aleta anal, de 35 a 39 escamas en la serie longitudinal y de 17 a 19 en la serie

circumpeduncular, costados de color plateado uniforme, con una mancha dorada sobre el opérculo y otra, negra y pequeña, en la base de la aleta pectoral, el ojo presenta un tejido adiposo que lo rodea (Harrison & Senou, 1999; Harrison, 2002; Harrison *et al.*, 2007).

Es una especie ampliamente distribuida en las costas americanas, sin embargo, recientemente se le ha reportado en el África occidental (Durand *et al.*, 2012a). En la costa oriental americana su distribución va desde Nueva Escocia (Canadá) hasta Argentina y en la costa occidental desde California hasta Chile (Nirchio *et al.*, 2005; Bonner, 2007). Habita fondos fangosos de lagunas salobres, estuarios y zonas costeras, la podemos encontrar también en el mar a poca profundidad en fondos arenosos o asociada a arrecifes. Migran hacia mar abierto o a la zona costera pelágica para desovar y después regresan a su hábitat en ríos, lagunas o estuarios. En su etapa post-larvaria se desplazan a la zona de oleaje y posteriormente a los estuarios y lagunas donde permanecen hasta alcanzar su etapa juvenil y madurez sexual. Esta especie puede formar cardúmenes en cualquier estadio de vida (Anderson, 1957). Los juveniles pueden alimentarse de organismos planctónicos, aunque prefieren el zooplancton si está disponible, los adultos consumen algas microscópicas bentónicas y filamentosas (Larson & Shanks, 1996; Cardona, 2016).

El desove es asincrónico a lo largo de su área de distribución mundial. En el Golfo de México, presenta tres periodos de desove, en el norte ocurre entre enero y mayo, con máxima actividad en abril (Anderson, 1958; Arnold & Thompson, 1958; Moore, 1974; Finucane *et al.*, 1978; Render *et al.*, 1995; Ibáñez & Gallardo-Cabello, 2005) en el sur

entre noviembre y enero (Ibáñez & Colín, 2014), mientras que para el sureste se presenta en noviembre, diciembre y de enero a abril (Pacheco-Almanzar *et al.*, 2017). Para la región caribeña, en Cuba ocurre un desove en verano y otro en invierno (Álvarez-Lajonchere, 1982). En el Océano Pacífico sucede al inicio de verano y al final de invierno (Cabral-Solís *et al.*, 2010) (Tablas 1 y 2).

Mugil curema ha sido considerada un complejo de especies crípticas (Durand *et al.*, 2012a), y un haplogrupo aparentemente monofilético (Durand *et al.*, 2012b). Su identificación por medio de métodos tradicionales no es sencilla ya que se puede observar un solapamiento de características merísticas con el de otras especies (e.g. *M. hospes*, *M. trichodon* y *M. rubrioculus*). Las sutiles diferencias interespecíficas de los caracteres merísticos y morfométricos han contribuido con la problemática taxonómica y de nomenclatura en el grupo (Nirchio & Oliveira, 2014). Además, se ha obtenido poca información filogenética de la familia Mugilidae a partir de caracteres morfo-anatómicos (Durand *et al.*, 2012a). Esta falta de resolución filogenética hace necesario el uso de marcadores moleculares para resolver los problemas filogenéticos y taxonómicos dentro del complejo de especies crípticas de *Mugil curema*.

Por ello, en el presente estudio se evaluó la variación de secuencias de ADN mitocondrial en las costas del Golfo de México y Pacífico Mexicano para inferir las relaciones filogenéticas intraespecíficas y así determinar la presencia de los diferentes linajes de *Mugil curema* evaluando los niveles de diferenciación genética entre ellos.

Tabla 1. Desove de *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) en el Golfo de México.

Zona	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Referencias
Laguna Madre Tamiahua	X		X										Ibáñez & Colín, 2014. Ibáñez & Gallardo- Cabello, 2004.
Alvarado y Tabasco Sabancuy, Campeche	X	X	X	X							X	X	Ibáñez & Colín, 2014. Pacheco-Almanzar <i>et al.</i> 2017
Celestún, Yucatán	X	X	X	X							X	X	Pacheco-Almanzar <i>et al.</i> 2017
Tunas de Zaza y Carolina del Norte Florida				X	X	X	X	X					Jacot, 1920. Anderson, 1957.
Oeste del Golfo de México Texas				X	X								Caldwell & Anderson, 1959. Hoese, 1965.
Atlántico (W) Brasil				X	X	X	X	X					Jacot, 1920. Maia & Vilela do Nascimento, 1980.

Tabla 2. Desove de *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) en el Pacífico mexicano.

Zona	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Referencias
Mazatlán, Sinaloa					X	X	X						Vasconcelos- Pérez <i>et al.</i> 1996.
Oaxaca, Sistema Lagunar Huave					X	X	X	X					Vasconcelos-Pérez <i>et al.</i> 1996.
Cuyutlán, Colima	X	X				X	X	X	X				Cabral- Solís <i>et al.</i> 2010.

1.3 Definición de especies crípticas

Las especies crípticas son dos o más taxones que han sido clasificados como una sola especie nominal debido a que morfológicamente son indistinguibles (Mayr, 1969;

Dobzhansky, 1972; Harwin, 2010). No pueden ser distinguidas con datos morfológicos por lo que la secuenciación de ADN es de gran ayuda para su identificación (Guevara-Chumacero & Sainoz-Aguirre, 2012).

El uso de métodos filogenéticos en conjunción con marcadores moleculares ha permitido definir a las especies crípticas como diferentes linajes evolutivos monofiléticos los cuales, dependiendo del grupo de interés y el marcador, presentan cierto porcentaje de distancia genética entre ellos. Por ejemplo, en el pez *Schindleria pietschmanni* los linajes crípticos se diferencian de 3.5 a 7% de distancia nucleotídica empleando el gen 16SrRNA bajo el modelo de Kimura dos parámetros (Kon *et al.*, 2007); mientras que para *Mugil curema* los cuatro linajes descritos hasta el momento por Durand & Borsa, (2015) tienen una diferencia de entre 3.2 a 5.4% de distancia nucleotídica bajo el modelo de Kimura dos parámetros usando secuencias del gen citocromo oxidasa I.

Para el uso de una correcta definición de especies crípticas no deben utilizarse los enfoques tradicionales sino los conceptos unificadores de especie, como el de Queiroz (2007), el cual dice que las especies son linajes de metapoblaciones divergentes donde el aislamiento reproductivo y la monofilia son dos propiedades indispensables (Durand & Borsa, 2015).

1.4 Importancia de los Marcadores moleculares para la correcta identificación de especies crípticas

Los marcadores moleculares son herramientas capaces de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples, pueden ser de tipo dominante o codominante, permiten localizar y aislar los genes de interés de manera indirecta con análisis de proteínas o directa con estudios de ADN mitocondrial, nuclear, de cloroplasto o ribosomal (Simpson, 1997). Constituyen un instrumento universal y una metodología de análisis uniforme que ha fortalecido y revitalizado el descubrimiento, descripción, categorización y explicación de la biodiversidad (Geller *et al.*, 2010; Zinger *et al.*, 2012).

Los estudios basados en ADN mitocondrial han sido de gran utilidad para la discriminación correcta de especies crípticas de mugílidos (Brower, 1994; Durand & Borsa, 2015), puesto que tienen una rápida detección de hibridación interespecífica, de variación genética entre individuos y la construcción de las relaciones evolutivas interespecíficas e intraespecíficas es posible debido a su alta tasa mutacional, 5 a 10 veces mayor que el ADN nuclear, su herencia uniparental y la inexistente recombinación (Astorga, 2008). Uno de los marcadores mitocondriales más empleados para el estudio de la biodiversidad e identificación de especies crípticas de mugílidos es el gen citocromo oxidasa I (COI) (Hebert *et al.*, 2003; Durand & Borsa, 2015).

La identificación molecular de especies crípticas de *Mugil curema* es necesaria debido a que es una especie de gran importancia comercial e indispensable en la ecología funcional de los ecosistemas costeros, incluyendo, estuarios, manglares, arrecifes y lagunas (Blaber, 2000; Lebreton *et al.*, 2011; Chang & Iizuka, 2012; Whitfield *et al.*, 2012).

1.5 Citocromo oxidasa I (COI)

Un fragmento estándar de COI de aproximadamente 658 pb es utilizado como un “código de barras de la vida” ya que permite identificar a diferentes especies porque cumple con los siguientes tres puntos esenciales (Hebert *et al.*, 2003; Kress & Erickson, 2008):

- I. Tiene una variabilidad y divergencia genética significativa al nivel de especie.
- II. Posee sitios flanqueantes conservados de manera tal que permite el desarrollo de oligonucleótidos universales.
- III. Puede obtenerse un tamaño de secuencia relativamente corto de forma tal que sea fácil su extracción y amplificación.

Según varios estudios, dicho gen permite la identificación de diferentes especies crípticas de peces (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2007; Hubert *et al.*, 2008). Sin embargo, entre algunos miembros de la comunidad de taxónomos se rechaza el uso de código de barras de la vida para la identificación de especies, debido a que se considera imposible establecer relaciones filogenéticas e identificar especies utilizando tan solo un fragmento de gen (Vences *et al.*, 2005; DeSalle, 2006).

En el caso particular de la especie nominal *Mugil curema* y de otras especies de la familia Mugilidae está comprobado el alto grado de confianza de un fragmento del gen

citocromo oxidasa I de 598 pb, como código de barras en la identificación de la mayoría de las especies crípticas de mugílidos (Durand *et al.*, 2016).

II. ANTECEDENTES

En su mayoría los estudios de *Mugil curema* han sido morfológicos y son pocos los que han usado herramientas moleculares como cariotipos y análisis de ADN mitocondrial los cuales han permitido resolver los problemas taxonómicos y descubrir la gran variabilidad intra e interespecífica (Avisé, 2004; Durand & Borsa, 2015).

Existen cerca de quince análisis moleculares de *Mugil curema* que van desde cariotipos hasta secuencias de ADN mitocondrial o nuclear. Estos se dividen en cuatro temáticas: sistemática molecular, filogeografía, genética de las poblaciones y citogenética (Rossi *et al.*, 2016) (Tabla 3).

Estudios recientes, basados en diferencias cariotípicas y mitocondriales, han identificado cuatro linajes o especies crípticas dentro del complejo de *Mugil curema* en costas del Pacífico este, occidente del Atlántico, Venezuela y costa occidental de África (Tabla 3). El primer linaje fue hallado en Brasil el cual tiene un número cromosómico $2n=28$, citotipo I (Nirchio *et al.*, 2005) considerado como la verdadera *M. curema* reportada por LeGrande & Fitzmons (1976) nombrado provisionalmente “T2” por Durand & Borsa (2015), y que coincide con el tipo II de Fraga *et al.* (2007); todo el Golfo de México pertenece a este linaje. El segundo cariotipo ($2n=24$, citotipo II), fue encontrado en Venezuela (Nirchio & Cequea, 1998; Nirchio *et al.*, 2003) el cual corresponde con el segundo linaje nombrado inicialmente como “*Mugil spp. N*” por

Durand & Borsa (2015) y actualmente como *Mugil margaritae* (Menezes *et al.*, 2015). El tercer cariotipo (2n=48, citotipo III) también ubicado en Venezuela y la costa del Pacífico en Panamá (Nirchio *et al.*, 2003; Nirchio *et al.*, 2007) fue descrito como *Mugil rubrioculus* por Harrison *et al.* (2007). El cuarto cariotipo (2n=46, citotipo IV) de Ecuador (Nirchio *et al.*, 2017) fue asignado al linaje nombrado momentáneamente como “*Mugil spp. O*” al cual pertenece todo el Pacífico mexicano desde California a Ecuador. Por último, el linaje endémico de las costas de África fue nombrado eventualmente como “*Mugil spp. M*” (Durand & Borsa, 2015).

De estos cuatro linajes, dos se encuentran en evidente alopatria *Mugil spp. O* y *Mugil spp. M* separados por el continente Americano y el Océano Atlántico, mientras que *Mugil spp. N* y T2 son simpátricas con probable aislamiento reproductivo (Durand & Borsa, 2015).

Hasta el momento no existen trabajos a nivel intraespecífico que señalen la posible existencia de especies crípticas en el complejo de *Mugil curema* en costas mexicanas.

Tabla 3. Estudios moleculares donde se reconoce la presencia de especies crípticas en *Mugil curema* a lo largo de su distribución geográfica.

Autores	Año	Marcadores	Resultado
Durand & Borsa	2015	16SrRNA, COI y citocromo <i>b</i> .	El complejo de especies crípticas de <i>M. curema</i> está conformado por 4.
Siccha-Ramírez <i>et al.</i>	2014	12SrRNA, 16SrRNA, ATP 6/8 sintasa, COI y cit. <i>b</i> .	Dos especies de <i>M. curema</i> (Brasil tipo I, Venezuela tipo II).

Durand <i>et al.</i>	2012 ^a	16SrRNA, COI y citocromo <i>b</i> .	<i>M. curema</i> es un complejo de especies.
Rodrigues-Filho <i>et al.</i>	2011	Intrón 5S.	Divergencia reciente junto con otras especies como <i>Mugil hospes</i> y <i>Mugil cephalus</i> .
Trape <i>et al.</i>	2009	16SrRNA.	El gen 16SrRNA es un marcador adecuado para la identificación de mugílidos.
Aurette <i>et al.</i>	2008	16SrRNA y citocromo <i>b</i> .	Dos especies hermanas en el complejo de <i>M. curema</i> (Brasil, Argentina, Bahía de Galveston, Venezuela y California México).
Heras <i>et al.</i>	2008 2006	Fenilalanina, COI, citocromo <i>b</i> y 12SrRNA.	Tres especies genéticamente diferentes o tipos de <i>M. curema</i> en las aguas americanas (Brasil, Bahía de Galveston, Argentina).
Peregrino-Uriarte	2007	16SrRNA y COI.	Existe una distancia genética entre mugílidos y robalos de 16 al 20%.
Fraga <i>et al.</i>	2007	16SrRNA y citocromo <i>b</i> .	<i>Mugil curema</i> tipo I y tipo II.
Rossi <i>et al.</i>	2005	Cariotipo.	Es necesario la identificación de especies crípticas (Venezuela, Brasil, Luisiana EUA), citotipo EUA 2n= 28.
Nirchio <i>et al.</i>	2017 2005-2007 2003 1998	COI y Cariotipo.	Presencia de tres diferentes especies en las aguas americanas (Venezuela, Brasil, Luisiana EUA).
Caldara <i>et al.</i>	1996	Citocromo <i>b</i> y 12SrRNA.	Marcada divergencia genética entre mugílidos.

III. JUSTIFICACIÓN

Existen variaciones reproductivas y morfométricas entre las localidades de *Mugil curema*, en el Golfo de México, las temporadas de desove están desfasadas y las hembras maduran sexualmente en el primer año, mientras que en las localidades del Pacífico mexicano el desove es relativamente sincrónico y las hembras maduran en el segundo año de edad (Cabral-Solís, 1999). Las variaciones morfométricas se

presentan principalmente en el diámetro ocular, el ancho y máxima altura del cuerpo. Estas variaciones morfométricas son discutidas por Ibáñez & Leonart (1996) e Ibáñez *et al.* (2006), quienes señalan la posible presencia de más de una población de *Mugil curema* en el Golfo de México debido a una gran variabilidad morfométrica.

Existen también variaciones ambientales y oceanográficas (temperatura, salinidad, corrientes marinas, etc.) que pueden dar paso a la formación de nuevos linajes debido a la disminución del flujo génico. Además del aislamiento geográfico entre el Océano Atlántico, el Golfo de México y el Pacífico mexicano desde hace más de dos millones de años aproximadamente (Hallam, 1981) que evidentemente provocó un aislamiento reproductivo entre las poblaciones de ambas costas.

Estas diferencias reproductivas, morfométricas, ambientales y oceanográficas, además de los antecedentes sobre la presencia de especies crípticas de *Mugil curema* a lo largo de su distribución geográfica, sugieren la posibilidad de presencia de especies crípticas en las costas de México.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Con base en la variabilidad morfométrica y en las temporadas de desove actual que presenta *Mugil curema* a lo largo de su área de distribución en las costas de México surge la siguiente pregunta:

- ¿Existen especies crípticas de *Mugil curema*, en las costas de México? Si existen ¿Cuáles son?

V. HIPÓTESIS

Si el aislamiento geográfico entre el Golfo de México y el Océano Pacífico, los desoves asincrónicos, la variabilidad morfométrica y ambiental han generado reducción del flujo génico y aislamiento reproductivo, entonces se espera la presencia de diferentes linajes evolutivos o especies crípticas de *Mugil curema* en las costas de México.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Identificar molecularmente especies crípticas de *Mugil curema* en las costas de México usando como marcador molecular secuencias del gen citocromo oxidasa I (COI).

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la estructura genética de *Mugil curema* en las costas de México.
- Inferir las relaciones filogenéticas intraespecíficas.
- Determinar tiempos de divergencia.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1.1 Muestreo

Se seleccionaron muestras de individuos de *Mugil curema* de colectas ya realizadas durante los años 2009-2015 por la Dra. Ana Laura Ibáñez Aguirre y el personal del

Laboratorio de Biología y Fisiología Pesquera, procedentes de once localidades del Golfo de México (GM) y tres del Pacífico mexicano (PM) (Fig.1). Cada muestra consistió en biopsias de aleta anal de 3 mm de diámetro fijadas en alcohol absoluto y posteriormente conservadas en alcohol al 70%. Se realizó la identificación de los ejemplares mediante el uso de claves taxonómicas para peces marinos de los autores Harrison & Senou (1999), Harrison (2002) y Harrison *et al.* (2007). Adicionalmente se obtuvieron secuencias del gen COI del GenBank que pertenecen a los linajes T2 y O, de especímenes originarios de E.U.A, México, Uruguay y Belice como grupo externo (Anexo 1). Las características y tamaño de muestra se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4. Características y tamaño de muestra. Se indica la localidad con su acronimia, las coordenadas geográficas (Lat=latitud, Long=longitud), tamaño de muestra (*n*) y el año de colecta. GM = Golfo de México; PM = Pacífico mexicano.

Localidad	Acronimia	Lat	Long	<i>n</i>	Año
Jacksonville (GM)	JA	30.32	-81.65	10	2015
Apalachicola (GM)	AP	29.72	-84.98	10	2015
San Antonio, Texas (GM)	SA	28.35	-96.76	10	2015
Laguna Madre, Tamaulipas (GM)	MA	25.06	-97.63	10	2009-2010
Laguna de Tamiahua, Veracruz (GM)	TA	21.27	-97.44	10	2009-2011
Río Cazones, Veracruz (GM)	CA	20.70	-97.31	10	2009-2010
Laguna de Alvarado, Veracruz (GM)	AV	18.77	-95.76	9	2008-2009

Laguna de Mecoacán, Tabasco (GM)	ME	18.39	-93.14	10	2008-2009
Sabancuy, Campeche (GM)	SB	18.97	-91.17	5	2015
Celestún, Yucatán (GM)	CE	20.85	-90.39	2	2015
Sisal, Yucatán (GM)	SI	21.16	-90.02	9	2015
Laguna Superior e Inferior, Oaxaca (PM)	OX	16.26	-94.74	10	2014
Río Balsas, Michoacán (PM)	BA	18.41	-100.07	10	2009
Cuyutlán, Colima (PM)	CU	18.91	-104.06	10	2009-2014
Número total de muestras				125	

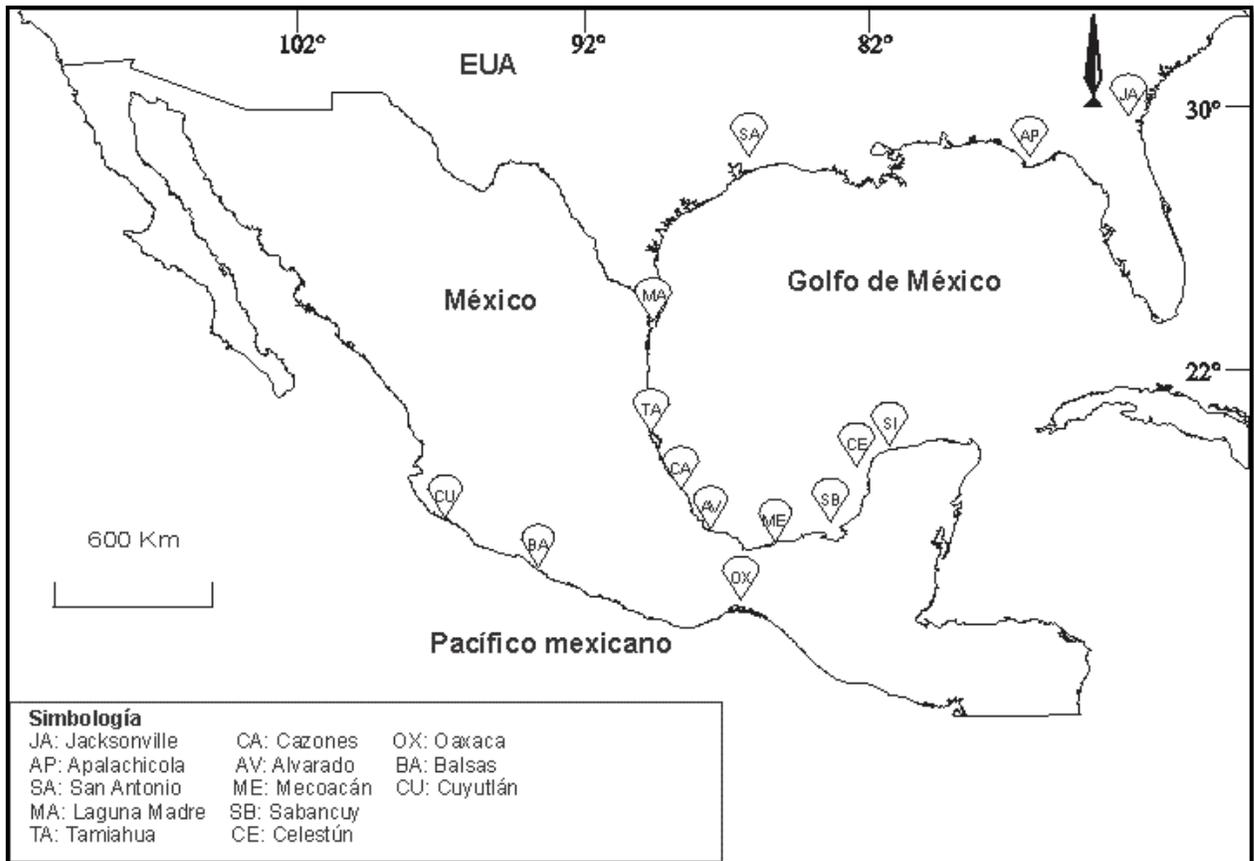


Fig. 1. Zonas de colecta de *Mugil curema* del 2009-2015.

7.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido de aleta usando el protocolo de extracción con sal común (modificado de Lopera-Barrero *et al.*, 2008, Anexo 2). Se realizaron diluciones de 50 ng/μl de cada muestra. La estimación de la concentración y pureza del ADN obtenido se realizó en un biofotómetro (NanoDrop 2000 C). La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1% teñido con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 1000X (Biotium) y posteriormente se visualizó bajo luz UV en un fotodocumentador (MiniLumi DNR). Las bandas de ADN obtenidas fueron comparadas con un marcador estándar de alto peso molecular de 50 a 2000 pb (Bioline).

7.1.3 Amplificación

Se amplificó un segmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) (Fig. 2) usando los oligos y las condiciones estandarizadas por Ward *et al.* (2005) (Tabla 5).

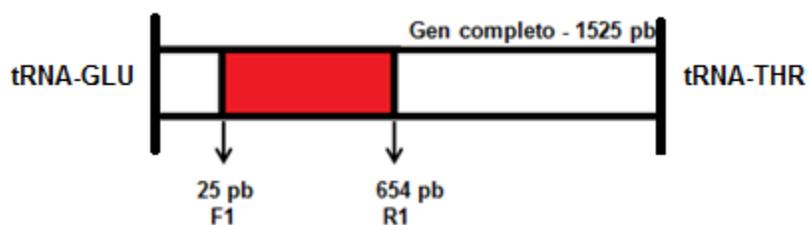


Fig. 2. Esquema representativo del fragmento amplificado del gen citocromo oxidasa I, en color rojo.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos del gen COI.

Cebadores universales	Marcador a amplificar	Secuencia	Referencia
FishF1	COI	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC- 3'	Ward <i>et al.</i> 2005

Las condiciones de amplificación para el gen citocromo oxidasa I fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 s., alineamiento a 58.6° C por 30 s. y finalmente la elongación a 72° C por 10 min.

La mezcla de reacción para el gen citocromo oxidasa I se llevó a un volumen final de 25 µl que incluyeron: 12.5 µl de Go *Taq* Green master mix (buffer pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP y 3 mM MgCl₂), 0.7 µl del primer Forward (F1) (40.8 µM), 0.7 µl del primer Reverse (R1) (41.2 µM), 10.1 µl de agua ultrapura inyectable (PiSA) y 1 µl de ADN (50 ng/µl). Los amplicones fueron purificados en Centri-Sep Spin Columns (Applied Biosystems) con Sephadex (Anexo 3), verificados en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 1000X (Biotium) y posteriormente se visualizaron bajo luz UV en un fotodocumentador (MiniLumi DNR).

7.1.4 Secuenciación

Para la obtención de secuencias nucleotídicas se preparó una reacción de secuenciación para cada uno de los primers con un volumen final de 10 µl que incluyó: 2.5 µl de agua ultrapura inyectable (PiSA), 3 µl de Buffer BigDye Terminator 10X (Applied Biosystems), 1 µl BigDye Terminator (Applied Biosystems), 1 µl del primer F1 o R1 y 2.5 µl del amplicón purificado. Las condiciones de amplificación fueron seguidas tal y como lo indican las especificaciones del fabricante Applied Biosystems. Al término de la reacción de secuenciación los amplicones fueron nuevamente purificados en

placas de purificación con Sephadex y fueron secuenciados automáticamente en un equipo ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems Hitachi).

7.1.5 Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas

La edición y alineamiento de las secuencias se realizaron con el programa BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) y el algoritmo Clustal W. La autenticidad de las secuencias se confirmó a partir de un análisis BLAST estándar nucleótido-nucleótido (Zhang *et al.*, 2000) en la base de datos del GenBank (Altschul *et al.*, 1990).

En el alineamiento del gen COI se obtuvieron secuencias de igual longitud, por lo que fue necesario editar solo una matriz con un tamaño de 626 pb.

7.1.6 Construcción de redes haplotípicas

Todas las secuencias fueron analizadas en el programa DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas, 2009) y el programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000) para obtener sus correspondientes haplotipos considerando a los gaps como un quinto estado.

La construcción de las redes haplotípicas se efectuó usando el algoritmo Median-Joining en el software PopART v. 1.7 (Bandelt *et al.*, 1999). Fueron evaluados los siguientes aspectos: número de haplotipos, número de haplogrupos formados, relación entre los haplogrupos, distribución de los haplotipos dentro de los haplogrupos y su lógica correspondencia geográfica.

7.1.7 Estructura genética poblacional

Se obtuvo el grado de estructuración genética dentro y entre localidades con un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) con 1000 permutaciones en el programa Arlequín v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

7.1.8 Selección del modelo evolutivo

Para seleccionar el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos más adecuado, la matriz fue sometida al análisis de los 88 modelos alternativos del programa jModelTest v. 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) bajo los criterios Akaike (AIC), Bayesian Information Criterion (BIC) y decisión theory method (DT). El modelo seleccionado para cada conjunto de datos, así como los parámetros de números de tipos de sustitución (Nst) y tasa evolutiva para sitios variables (Rates) fueron utilizados en los análisis filogenéticos.

El modelo evolutivo utilizado en los análisis de distancias genéticas fue seleccionado usando el método estadístico de Máxima Verosimilitud y el filtro de intercambio de ramas *Very Strong* en MEGA v. 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016).

7.1.9 Relaciones filogenéticas intraespecíficas

Las relaciones filogenéticas intraespecíficas entre los haplotipos del gen COI fueron obtenidas a partir de los métodos de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) (Felsenstein, 1973) y Análisis Bayesiano (AB).

La estabilidad de los análisis se evaluó considerando el número de clados formados y las relaciones filogenéticas intraespecíficas establecidas entre ellos. También se evaluó la estabilidad interna de las ramas de cada árbol con un análisis Bootstrap (Felsenstein, 1985) de 1000 repeticiones, probando diferentes combinaciones de grupos externos seleccionados a partir de publicaciones previas (Steinke *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2012a; Siccha-Ramírez *et al.*, 2014; Denys *et al.*, 2015; Durand & Borsa, 2015; Durand *et al.*, 2016) considerando las relaciones filogenéticas con el grupo interno y la disponibilidad de secuencias en la base de datos del GenBank. Para realizar las reconstrucciones filogenéticas del gen COI se utilizaron secuencias de *Mugil cephalus* (Mc) (JQ060560), *Mugil trichodon* (Mt) (JX185178), *Mugil hospes* (Mh) (JQ060607), *Mugil liza* (MI) (JQ060610), *Gasterosteus acuelatus* (Ga) (KR862861), *Abudefduf vaigiensis* (Av) (FJ582646), (Anexo 1) como grupo externo.

El análisis de NJ fue realizado en el programa MEGA v. 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016) usando el modelo evolutivo Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980). El árbol de MP fue construido en el programa Nona 2.0 y Winclada 1.0 (Goloboff, 1999; Nixon, 1999-2002)

con las estrategias de búsqueda heurística Tree Bisection Reconnection (TBR + TBR) y Ratchet (Island Hop). Al término de cada análisis se recuperaron los índices de consistencia (IC) e índices de retención (IR) para analizar la cantidad de homoplasia presente en los datos que fueron retenidos en cada árbol.

El análisis de MV se realizó con el programa TOPALi v. 2.5 (Milne *et al.*, 2004), usando el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos que fue seleccionado con el Criterio de Información de Akaike (AIC) como está implementado en el programa jModelTest con un nivel de significancia de 0.01. El modelo HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) fue el modelo de sustitución de nucleótidos seleccionado que más se ajustó a los datos.

El análisis Bayesiano se realizó con el programa TOPALi v. 2.5 (Milne *et al.*, 2004), con el modelo evolutivo seleccionado por jModelTest. Se usaron cinco cadenas de Markov, 25% de burnin y 10, 000,000 de generaciones.

7.2 Análisis de distancia genética

Para determinar la diferenciación genética se estimó la distancia media corregida entre localidades y haplotipos en MEGA v. 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016) usando el modelo evolutivo Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980). Al término de cada análisis se guardaron los sitios variables de las secuencias analizadas (Anexo 4).

7.2.1 Tiempos de divergencia

Para determinar el tiempo de divergencia se utilizó el programa Isolation with Migration (IM) (Hey & Nielsen, 2004). Para obtener la tasa evolutiva requerida (substitución/gen/años) se convirtió la reportada por Shen *et al.* (2011) de 1.6% que está dada por “substitución/sitio/millones de años” multiplicando la tasa evolutiva por la longitud del gen entre un millón de años. El modelo evolutivo utilizado fue el HKY y el parámetro escalar inherente 0.25.

Se realizaron una serie de pruebas para determinar los valores de los parámetros adecuados y el número de genealogías necesarias con la finalidad de obtener una buena distribución del parámetro t . El valor de los parámetros utilizados para las tasas de migración ($-m1$ y $-m2$) como para θ ($-q1$) fue de 0.0001, para los tiempos de divergencia ($-t$) 30 y 10, un burnin ($-b$) de 500,000 pasos y 6,000, 000 generaciones ($-L$). Se obtuvo el tiempo de divergencia entre el Golfo de México junto con las secuencias de Oaxaca y el Pacífico mexicano, así como entre los dos linajes del Pacífico mexicano dividiendo la unidad del tiempo (β) entre la tasa de mutación (U) y de igual forma se obtuvo el margen de error dividiendo (β) de los límites inferior y superior entre (U).

VIII. RESULTADOS

8.1 ADN y amplicones

En todas las extracciones se obtuvo ADN de alto peso molecular con concentraciones aproximadas de 300 a 1200 ng/ μ l, en cuanto a la pureza se obtuvieron valores de 1.5 a 2.1 (A260/A280). Las amplificaciones para el gen COI fueron aproximadamente de 700 pb (Fig. 3), fragmento que representa el 42.5% de la longitud total de este gen.

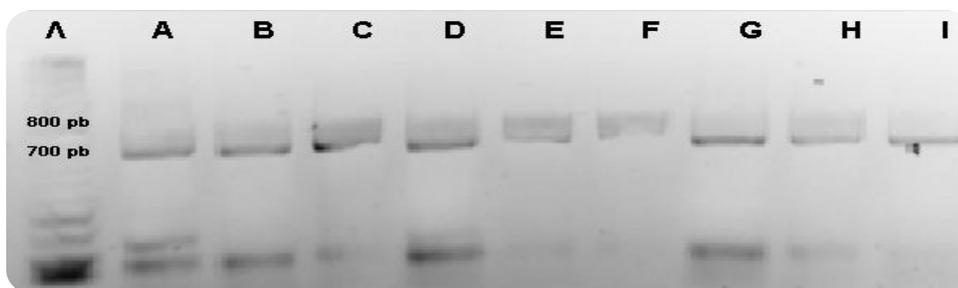


Fig. 3. Electroforesis de un fragmento de aproximadamente 700 pb del gen COI. En el primer carril se observan las bandas de referencia del marcador estándar de alto peso molecular (50-2000 pb) (λ), en los carriles resultantes (A-I) se observan las muestras amplificadas.

8.2 Secuencias nucleotídicas

De un total de 125 secuencias nucleotídicas del gen COI se obtuvo una matriz de 626 pb, en la cual se encontraron 537 caracteres constantes, 72 segregativos y 38 parsimoniosamente informativos. El promedio de la composición nucleotídica fue de: A= 22.84%, C= 29.71%, G=18.37% y T= 29.07%.

En general los electroferogramas tuvieron una buena señal y picos bien definidos (Fig. 4).

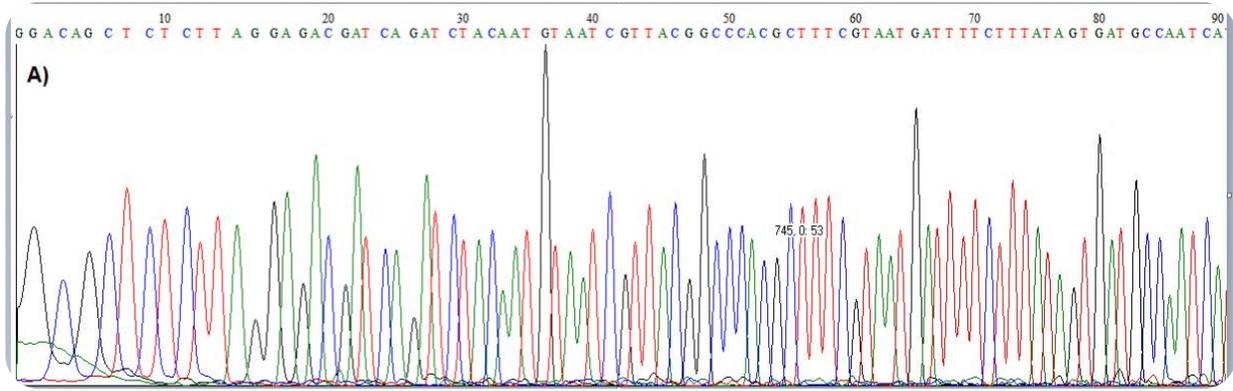


Fig. 4. Electroferograma de un fragmento del gen COI de *Mugil curema*.

8.3 Red Haplotípica

Para las 125 secuencias analizadas de las catorce localidades de estudio se obtuvo una red de buena resolución de la cual se identificaron 17 haplotipos diferentes (H) (Tabla 6) formando dos haplogrupos (Hg) separados por 27 pasos mutacionales y una distancia genética del 6.4% (Fig. 5). En el mapa de distribución de haplotipos (Fig.6) se observa la formación de los dos haplogrupos correspondientes al Golfo de México y al Pacífico mexicano, con la excepción de la localidad de Oaxaca que se posicionó dentro del haplogrupo del Golfo de México (haplotipos 2 y 4).

En la figura 6 se observan cinco haplotipos compartidos (H1, H2, H4, H6 y H12) y ocho únicos (H3, H5, H7, H8, H9, H10, H11 y H13) para el haplogrupo GM. El H1 se comparte entre Jacksonville, Apalachicola, Tamiahua, Alvarado y Sisal, todas las

localidades del GM comparten el H2 el cual representa el 60% de los individuos muestreados, el H4 para Jacksonville, Apalachicola, San Antonio y Mecoacán, mientras que el H12 entre Celestún y Sisal. Los ocho haplotipos únicos corresponden a las localidades de Jacksonville, Apalachicola, Alvarado, Mecoacán y Sisal. La localidad con un mayor número de haplotipos es Alvarado con seis (H1, H2, H7, H8, H9 y H10), seguida de Sisal con cinco (H1, H2, H6, H12 y H13).

Para el PM se observa un haplotipo compartido (H15) entre el Río Balsas y Cuyutlán y 3 haplotipos únicos (H14, H16 y H17) del Río Balsas (Tabla 6)

Tabla 6. Lista de haplotipos encontrados (H). Se indica el número de Individuos (NI) que comparten un mismo haplotipo, el porcentaje (%) correspondiente a los 125 individuos analizados y el código de cada muestra (CM).

H	NI	%	CM
1	11	8.7	Ja1, Ja8, Ja10, Ap5 , Ta12, Av5, Av6 , Si4 , Si18, Si19, Si21
2	76	60	Ja2, Ja5, Ja6, Ja7, Ja9, Ap1, Ap2, Ap3, Ap6, Ap7, Ap8, Ap10, Sn1, Sn2 , Sn3 , Sn5 , Sn7 , Sn8, Sn9, Sn10, Sn11, Ma1, Ma2 , Ma3, Ma4, Ma5, Ma6, Ma7, Ma8, Ma9, Ma10, Ta2, Ta3, Ta4, Ta5, Ta7, Ta9, Ta10, Ta11, Ta13, Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, Ca5, Ca8, Ca9, Ca10, Ca12, Av7, Av12, Me1, Me5, Me6, Me7, Me9, Me10, Me11, Me12, Sb2, Sb4, Sb9, Sb12, Sb15, Si14, Si27, Ce5, Ox1, Ox3, Ox5, Ox6, Ox7, Ox8, Ox10, Ox11, Ox12
3	1	0.8	Ja4
4	5	4	Ja11, Ap4, Sn6, Me13, Ox2
5	1	0.8	Ap9
6	2	1.6	Ca6, Si16
7	1	0.8	Av1
8	2	1.6	Av2, Av3
9	1	0.8	Av9
10	1	0.8	Av10
11	1	0.8	Me2
12	2	1.6	Si13, Ce13
13	1	0.8	Si17
14	1	0.8	Ba3
15	17	13	Ba4, Ba5, Ba6, Ba7, Ba8, Ba10, Ba17, Cu1, Cu2, Cu3, Cu4, Cu5, Cu7, Cu8, Cu9, Cu10, Cu30
16	1	0.8	Ba9
17	1	0.8	Ba15

Correspondencia geográfica

Green	Jacksonville
Orange	Apalachicola
Pink	San Antonio
Light Blue	Tamaulipas
Dark Blue	Tamiahua
Yellow	Cazones
Purple	Alvarado
Brown	Mecoacán
Red	Sabancuy
Grey	Celestún
Light Yellow	Sisal
Dark Red	Oaxaca
Pink	Balsas
Purple	Cuyutlán

Haplogrupos (Hg)

- 1 Golfo de México y Oaxaca
- 2 Pacífico mexicano

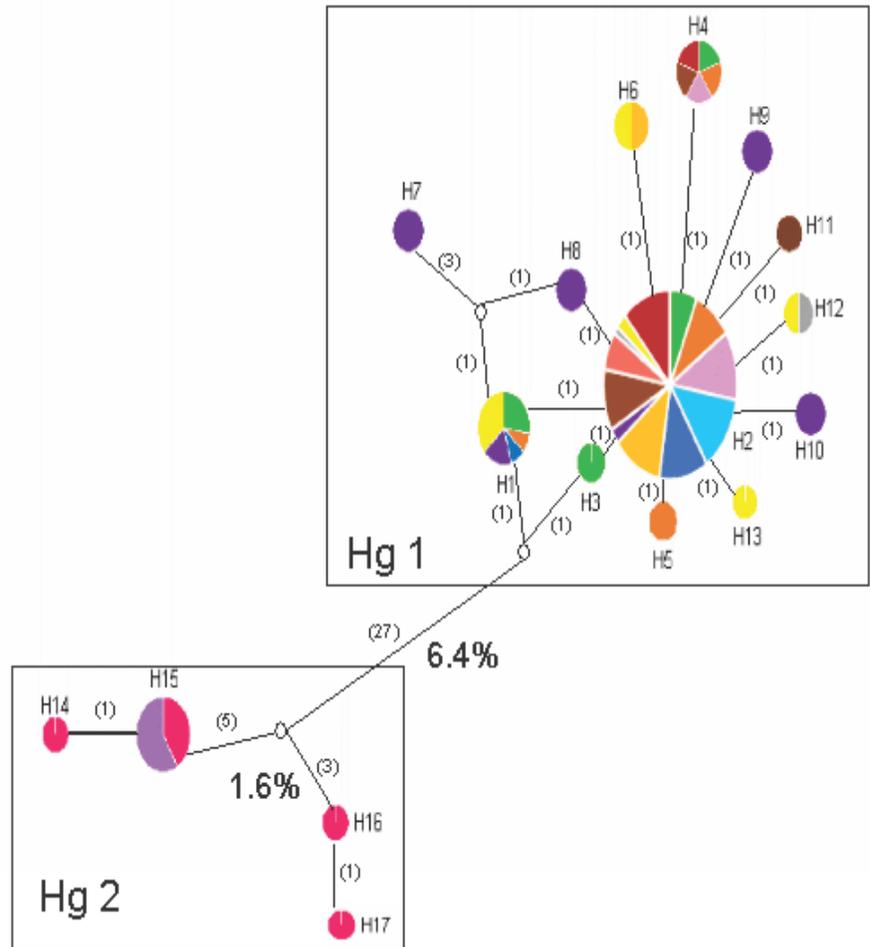


Fig. 5. Red haplotípica ilustrando la presencia de los dos haplogrupos de *Mugil curema* formados a partir de secuencias de COI. Las líneas que conectan cada haplotipo indican los pasos mutacionales entre ellos. Los pequeños círculos blancos indican haplotipos hipotéticos y los diferentes tamaños de los círculos la frecuencia haplotípica. Los colores representan la correspondencia geográfica de los haplotipos.

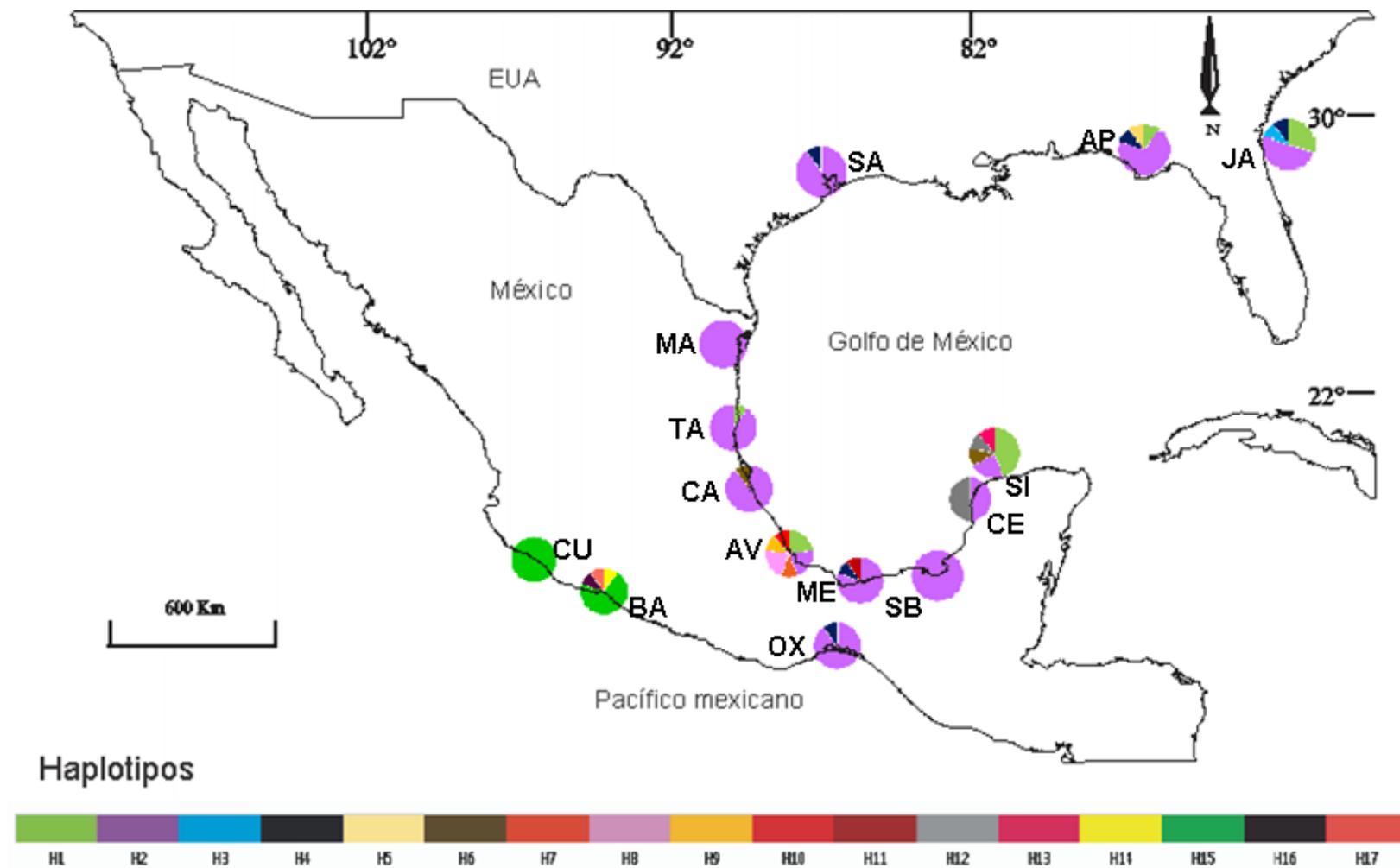


Fig. 6. Mapa de haplotipos para *Mugil curema*, a lo largo de su distribución. El círculo representa a la población muestreada y en la parte inferior se muestra los códigos de color para cada haplotipo.

8.4 Estructuración genética

Los resultados del AMOVA entre las catorce localidades indicaron una alta variación genética entre ellas ($F_{ST}=0.92$; $P<0.05$; Tabla 7). Entre los puntos de colecta del Golfo de México la variación se presenta dentro de las localidades ($F_{ST}=0.07$ $P<0.05$; Tabla 8). Para el Pacífico mexicano existe una alta variación entre las tres localidades ($F_{ST}=0.95$; $P<0.05$; Tabla 9).

Tabla 7. Resultados del AMOVA para el total de las localidades.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación	F_{ST}
Entre localidades	558.97	4.79	92.94	0.92*
Dentro de las localidades	40.43	0.36	7.05	

*** $P<0.05$**

Tabla 8. Resultados del AMOVA para las localidades del Golfo de México.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación	F_{ST}
Entre localidades	5.10	0.02	7.76	0.07*
Dentro de las localidades	24.93	0.29	92.23	

*** $P<0.05$**

Tabla 9. Resultados del AMOVA para las localidades del Pacífico mexicano.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación	F_{ST}
Entre localidades	222.33	11.05	95.06	0.95*
Dentro de las localidades	15.50	0.57	4.93	

* $P < 0.05$

8.5 Reconstrucciones filogenéticas

Todas las topologías obtenidas del gen COI con los métodos NJ, MP, MV y AB fueron similares. Sin embargo, el análisis bayesiano fue el que proporcionó la mayor resolución y el mayor soporte en las ramas internas. En la figura 7 se muestra la reconstrucción filogenética intraespecífica bayesiana con los cuatro valores de soporte de cada uno de análisis para los diecisiete haplotipos obtenidos. La filogenia recuperó dos clados principales sustentados por altos valores de soporte Bootstrap, de probabilidad posterior bayesiana (PPB) y el (IC). El clado basal corresponde al linaje del Golfo de México dentro del cual se encuentran los individuos que pertenecen a la localidad de Oaxaca de la Laguna Superior e Inferior (H2 y H4). El clado hermano del PM está formado por dos subgrupos mitocondriales intraespecíficos: 1) Pacífico mexicano norte, 2) Pacífico mexicano sur; en el grupo uno se encuentran todos los individuos del Cuyutlán y ocho del Río Balsas, junto con una secuencia del GenBank correspondiente a La Paz, Baja California, mientras que el grupo dos está formado por

los haplotipos únicos (H16 y H17) del Río Balsas y tres secuencias procedentes de Chiapas obtenidas en el GenBank. La distribución de los diecisiete haplotipos en los dos clados es congruente con los resultados de la red haplotípica. Además, los tres grupos (Golfo de México/Oaxaca, Pacífico mexicano norte y Pacífico mexicano sur) coinciden con los linajes: T2 de la distribución del Atlántico occidente y O de la costa del Pacífico este, propuestos por Durand *et al.* (2012a), Durand & Borsa (2015) y Durand *et al.* (2016).

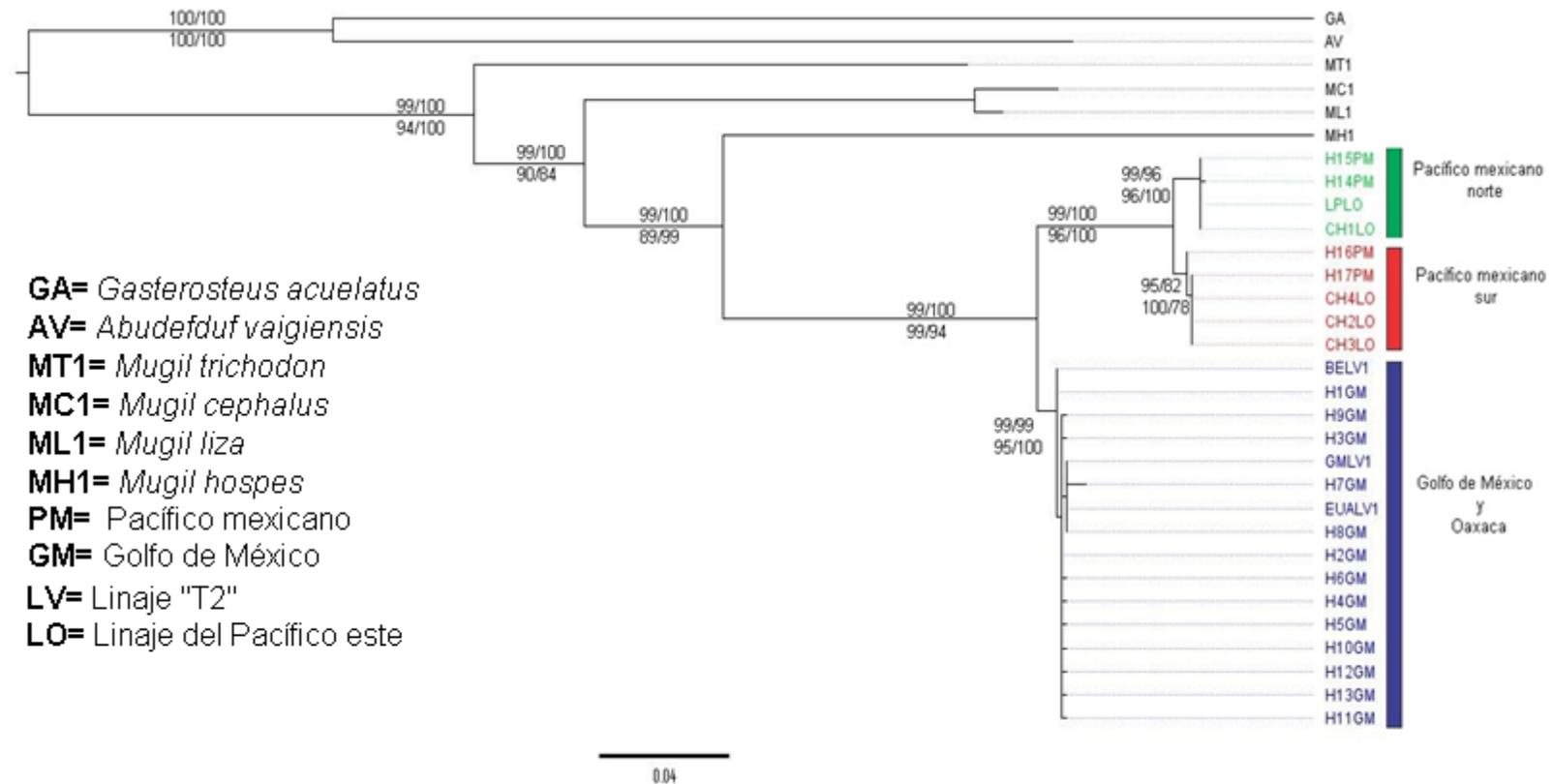


Fig. 7. Reconstrucción filogenética Bayesiana de los 17 haplotipos del gen COI para *Mugil curema*. Los valores de soporte en las ramas indican: arriba (Bootstrap NJ/ Bootstrap MP); abajo (Bootstrap MV/ Probabilidad Posterior Bayesiana). IC= 68, IR= 78. Los colores indican los tres linajes con su correspondencia geográfica.

8.6 Distancia genética

El porcentaje de distancia media corregida entre las catorce localidades de estudio varió entre 0.1 a 5.8% (Tabla 10), entre los 17 haplotipos obtenidos para el gen COI de 0.2 a 6.4% (Tabla 11). Entre los dos grupos GM/Oaxaca y PM la distancia media corregida fue de 6.4% y entre los dos subgrupos del PM de 1.6%.

Tabla 10. Porcentaje de distancia media entre las catorce localidades.

	JA	AP	SN	MA	TA	CA	AV	ME	SB	SI	CE	OX	BA	CU
JA														
AP	0.1													
SN	0.1	0.1												
MA	0.1	0.0	0.0											
TA	0.1	0.1	0.0	0.0										
CA	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0									
AV	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2								
ME	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2							
SB	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0						
SI	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1					
CE	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2				
OX	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1			
BA	5.6	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	5.7	5.7	5.7	5.8	5.7		
CU	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	5.8	5.7	5.7	5.8	5.7	0.3	

Tabla 11. Porcentaje de distancia media entre los 17 haplotipos para el gen COI.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17
H1																	
H2	0.2																
H3	0.3	0.2															
H4	0.3	0.2	0.3														
H5	0.3	0.2	0.3	0.3													
H6	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3												
H7	0.6	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0											
H8	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.6										
H9	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	1.0	0.3									
H10	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	1.0	0.3	0.3								
H11	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	1.0	0.3	0.3	0.3							
H12	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	1.0	0.3	0.3	0.3	0.3						
H13	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	1.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3					
H14	5.7	5.9	5.7	6.1	6.1	6.1	6.4	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1				
H15	5.6	5.7	5.6	5.9	5.9	5.9	6.3	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	0.2		
H16	5.2	5.4	5.2	5.6	5.6	5.6	5.9	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	1.5	1.3		
H17	5.4	5.6	5.4	5.7	5.7	5.7	6.1	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	1.6	1.5	0.2	

8.7 Tiempos de divergencia

El tiempo de divergencia entre el Golfo de México/Oaxaca y Pacífico mexicano es de 1, 522,000 años con un margen de error de (466,700–632, 400 años). Para los dos

linajes del Pacífico mexicano es de 438,000 años y un margen de error de (230,630–354,430 años).

IX. DISCUSIÓN

9.1 Comparación de métodos y resultados con análisis moleculares previos de *Mugil curema*

Los métodos de extracción de ADN en los estudios previos de *Mugil curema* mostrados en la Tabla 3 varían con respecto al presente estudio en cuanto al tipo de muestra usado; la gran mayoría utiliza tejido muscular a excepción de Durand *et al.* (2012a) quienes ocuparon músculo y aleta. Para este estudio la elección del tejido de aleta se debió a que en ésta existe menor presencia de lípidos y proteínas a diferencia del tejido muscular lo que permitió obtener un ADN de mejor calidad por su alta concentración. En cuanto a los protocolos de extracción Siccha-Ramírez *et al.* (2014) utilizó kits mientras que Durand *et al.* (2012a) fenol-cloroformo. En este trabajo se eligió el protocolo de extracción con sal común de Lopera-Barrero *et al.* (2008), debido a que es más eficaz, simple, económico y no contaminante, a diferencia de fenol-cloroformo. De los estudios para *M. curema* con base molecular, reportados en la Tabla 3, solo cinco amplificaron secuencias del gen citocromo oxidasa I de diferentes longitudes que

van desde 546 pb (Nirchio *et al.*, 2017) a 655 pb (Siccha-Ramírez *et al.*, 2014). En este estudio se obtuvo un fragmento de 626 pb, dentro del rango obtenido en publicaciones previas; (Siccha-Ramírez *et al.*, 2014; Nirchio *et al.*, 2017). Es importante mencionar que la longitud obtenida fue mayor a los 598 pb reportados por Durand *et al.* (2012a) lo que podría deberse a los diferentes métodos de extracción, a pesar de utilizar los mismos cebadores reportados por Ward *et al.* (2005).

El número de secuencias utilizadas para las reconstrucciones filogenéticas de *M. curema* en seis estudios (Heras *et al.*, 2006; Fraga *et al.*, 2007; Aurelle *et al.*, 2008; Durand *et al.*, 2012a; Siccha-Ramírez *et al.*, 2014; Nirchio *et al.*, 2017) no fueron suficientes para una adecuada representación de las costas del GM y PM. Por ejemplo, Heras (2006) utilizó solo cuatro secuencias localizadas al norte del GM en la bahía de Galveston, Texas, mientras que Durand *et al.* (2012a) tiene solo una para representar el GM, en la Laguna Madre, Tamaulipas y cinco para el PM, una para La Paz, Baja California y cuatro para Chiapas. En este estudio se logró obtener un muestreo más representativo de las costas de México, así como un mayor número de secuencias por localidad.

De los trabajos mostrados en la Tabla 3, solo Siccha-Ramírez *et al.* (2014) obtuvo una red de haplotipos para *Mugil liza*. En este trabajo se obtuvo la red de haplotipos para la distribución de las costas de México. Las redes haplotípicas son la mejor opción para la representación de las relaciones genealógicas debido a que se puede observar con claridad los nodos ancestrales, los cambios mutacionales entre haplotipos y la función de verosimilitud se maximiza. La filogenia *sensu stricto* es solo a nivel

interespecífico debido a que las relaciones de individuos de diferentes especies son jerárquicas, es decir, la cantidad de mutaciones en una escala de tiempo es mayor que la que se puede obtener a un nivel de especie; por eso, de acuerdo con Posada & Crandall (2001) las redes haplotípicas son la mejor representación de la coalescencia evolutiva de *M. curema*.

En cuanto a los métodos de reconstrucción filogenética solamente Heras (2006) reportó cuatro análisis (NJ, MP, MV y AB), mientras que Durand *et al.* (2012a) solo tres NJ, MV y AB, de los cuales le otorgaron mayor importancia al de NJ en su publicación más reciente (Durand *et al.*, 2016), ya que ha permitido identificar especies crípticas de peces en grupos de morfología compleja (Hebert *et al.*, 2003). Sin embargo, el análisis de NJ no es un método filogenético ya que no toma en cuenta la relación ancestro-descendiente (Peña, 2011). El criterio general es que no existe un mejor método entre los tres ya establecidos para la reconstrucción de las hipótesis filogenéticas (MP, MV y AB) pero la tendencia en cuanto a número de publicaciones son los análisis con enfoques probabilísticos (MV y AB) (Luna *et al.*, 2005). En este estudio se realizaron los cuatro métodos con el objetivo de tener una mayor robustez de las relaciones filogenéticas intraespecíficas de *M. curema* en las costas de México.

En este estudio se reporta por primera vez los tiempos de divergencia para linajes de *M. curema*. Actualmente solo se conoce el tiempo de divergencia con respecto a *Mugil cephalus* por Santini *et al.* (2015) quienes emplearon el programa de reconstrucción filogenética bayesiana Beast (Drummond *et al.*, 2012) útil solamente para el nivel

interespecífico. En este estudio se utilizó “Isolation with migrate” diseñado para datos intraespecíficos.

Los porcentajes de distancia media corregida son ligeramente mayores que los ya establecidos por Durand & Borsa (2015), es importante mencionar que ninguno de los trabajos ya discutidos anteriormente realizó un análisis de varianza molecular, el cual es indispensable para datos intraespecíficos ya que confirma la distancia genética entre las poblaciones.

9.2 Diferenciación genética del Golfo de México vs. Pacífico mexicano

Las reconstrucciones filogenéticas intraespecíficas, las redes de haplotipos, los valores de distancia genética (6.4%) y el AMOVA ($F_{ST}=0.92$) apoyan la monofilia de dos haplogrupos principales, Golfo de México/Oaxaca y Pacífico Mexicano. Estos haplogrupos son congruentes geográficamente con el linaje T2 de la distribución del Atlántico occidente y O de las costas del Pacífico, respectivamente, propuestos por Durand & Borsa (2015). La distancia genética obtenida es ligeramente mayor que la propuesta por Durand & Borsa (2015) de 3.2 a 5.4 %.

Estos haplogrupos pueden representar dos especies crípticas debido a la evidente separación de los linajes monofiléticos, los diferentes haplotipos entre el GM/ Oaxaca y PM, y el alto valor de distancia y estructura genética entre los dos grupos, los cuales son elementos indispensables para la determinación de especies crípticas (Queiroz, 2007; Durand & Borsa, 2015). El tiempo de divergencia obtenido entre los dos

haplogrupos fue de 1.5 ma, correspondiente al Pleistoceno, posterior al cierre del Istmo de Panamá (2.8 ma), que provocó un aislamiento reproductivo entre las poblaciones de ambas cuencas. También es congruente con el final de las tasas de migración de organismos marinos entre las cuencas del Atlántico y el Pacífico hace 1.03-4.35 ma, reportadas por Bacon *et al.* (2015).

El cierre del Istmo de Panamá es el evento vicariante más importante que propició la formación de un sin fin de especies crípticas, gemínidas o gemelas de varios grupos de fauna marina y dulceacuícola. Esta hipótesis es corroborada por varios estudios, como el trabajo de McMahan *et al.* (2013), donde se reportan linajes crípticos utilizando secuencias del gen citocromo *b* en la lisa de río (*Agonostomus monticola*) un mugílido que presenta alta diferenciación genética (15.7%) entre el linaje del Pacífico B y el del Golfo de México. Esta separación de linajes también se ha reportado por Castillo-Olguín *et al.* (2012) con el tiburón martillo *Sphyrna lewini*, un grupo exclusivamente marino, utilizando secuencias de región control de mitocondria. Ellos reportaron un clado ancestral del Golfo de México separado claramente del linaje del Pacífico mexicano formado más recientemente. Los dos estudios citados anteriormente concluyen que la disyunción entre las poblaciones del GM y el PM es debida al cierre del Istmo de Panamá, aunque es importante mencionar que el nivel de diferenciación genética y el tiempo de divergencia es variable debido a factores como la historia de vida de cada especie y el tipo de marcador utilizado.

De acuerdo con O´Dea *et al.* (2016), los tiempos de divergencia para algunas especies marinas y dulceacuícolas pueden ser reportados antes o después del cierre del Istmo

de Panamá; antes debido al uso de un fósil para la calibración del reloj molecular o después por la implementación de una tasa mutacional mitocondrial que puede ser aproximadamente de 1.66% por millón de años para todos los genes y taxa de ambos lados del Istmo. En el caso de los linajes de *Agonostomus monticola* el tiempo de divergencia es de 7 ma debido a que se ocupó un fósil para la calibración del reloj molecular; en otro estudio de Galván–Quesada *et al.* (2016), donde también se diferencian linajes Pacífico y Atlántico del pez naca (*Dormitator* sp.) utilizando como marcador el gen citocromo *b* se utilizó una tasa evolutiva mitocondrial de 1.5% por millón de años y se obtuvo un tiempo de divergencia de 0.3-3.1 ma. En nuestro estudio, utilizamos una tasa evolutiva mitocondrial similar para *M. curema* (1.6% por millón de años) y los tiempos de divergencia resultaron similares a los linajes obtenidos en *Dormitator*.

9.3 Estructura genética poblacional en el Golfo de México

Las variaciones oceanográficas, morfométricas y en las temporadas de desove de *M. curema* (Anderson, 1958; Arnold & Thompson, 1958; Moore, 1974; Finucane *et al.*, 1978; Render *et al.*, 1995; Ibáñez & Gallardo-Cabello, 2005; Ibáñez & Colín, 2014; Pacheco-Almanzar *et al.* 2017) , previo a este estudio, sugerían una posible diferenciación poblacional y por lo tanto el hallazgo de más linajes crípticos para el Golfo de México y el Atlántico, sin embargo los resultados demostraron nula estructuración genética ($F_{ST} = 0.07$) y una variación mayor dentro de las localidades;

así como la formación de un solo haplogrupo y linaje que corrobora la homogeneidad genética poblacional.

Esta homogeneidad genética puede ser debida a la influencia de procesos históricos durante la evolución geológica del Golfo de México y a la formación de las estructuras oceanográficas como corrientes, giros y surgencias a finales del Oligoceno (Kotel'nikov *et al.*, 2014) las cuales pudieron haber aumentado la mezcla o dispersión de larvas y adultos de una manera significativa hasta el Pleistoceno tardío; actualmente continúan teniendo un importante rol en la distribución de larvas de *M. curema* a lo largo de la línea costera del GM (Monreal *et al.*, 2004). Podemos inferir también que durante el Mioceno y Plioceno el retroceso de la línea costera (Arroyo- Cabrales *et al.*, 2008) pudo haber provocado la migración de los individuos del GM.

Por otro lado, no solo la dispersión de larvas por medio de las estructuras oceanográficas puede determinar la estructura genética poblacional o la diversificación de linajes de peces (Tellier *et al.*, 2009, Zakas *et al.*, 2009, Brante *et al.*, 2012), también el comportamiento de las larvas, la disponibilidad de alimento o hábitat y los efectos del paleoclima pueden generar o mantener patrones no esperados de la estructura genética (Sotka *et al.*, 2004). De acuerdo con Kinlan & Gaines (2003), las larvas de peces que tienen la característica de viajar cientos de kilómetros durante su desarrollo tienden a exhibir una estructura genética poblacional homogénea o panmítica. En este sentido, las larvas y los adultos de *M. curema* durante las migraciones reproductivas a mar abierto pueden desplazarse por medio de las corrientes y giros a grandes distancias de aproximadamente 200 km (Manooch & Mason, 1984; Ditty & Shaw, 1996)

por lo que esto podría explicar también la homogeneidad genética a lo largo del Golfo de México y Atlántico.

Contrario a estos patrones, los resultados obtenidos con microsatélites utilizando las mismas muestras y localidades por Pacheco-Almanzar *et al.* (2017), muestran la presencia de tres grupos genéticos diferenciados a lo largo del Golfo de México y Atlántico: a) representado por las localidades de Sabancuy, Celestún y Sisal; b) presencia de San Antonio y las lagunas de Alvarado y Mecoacán; c) Laguna Madre, Tamiahua, Cazones, Apalachicola y Jacksonville. Este contraste en los resultados se debe a que los microsatélites pueden detectar una escala de tiempo más reciente que el gen citocromo oxidasa I el cual describe la estructura genética de las localidades en función de los procesos históricos y no actuales (Carvalho & Hauser, 1994).

La estructura genética reciente se debe a la heterogeneidad ambiental geomorfológica y ecológica del GM y Caribe que se estableció posterior al Pleistoceno. La formación temprana del GM y sus estructuras oceanográficas permitieron el flujo genético entre las localidades en el pasado manteniendo así una estructura genética homogénea.

Por otro lado, nuestros resultados indican que las localidades de Alvarado (Veracruz) y Sisal (Yucatán) presentan el mayor número de haplotipos en comparación con las otras localidades, lo cual puede ser debido a que las larvas aseguran su sobrevivencia desplazándose a zonas geográficas con una mayor disponibilidad de alimento o hábitat adecuado para su crianza y alimentación (Urho, 1999) además de la influencia de las corrientes costeras en la dispersión larvaria.

En este sentido, en las costas de Veracruz durante la temporada de lluvias en la cual se lleva a cabo los procesos de dispersión larvaria favorable debido a que hay una mayor disponibilidad de alimento (Okolodkov *et al.*, 2011), actualmente se reporta una de las mayores densidades de zooplancton e ictioplancton aunque es la zona costera de Campeche la que registra la mayor biomasa en todo el Golfo de México (Sanvicente-Añorve, 1990, Sánchez-Velasco *et al.*, 1996). Uno de los principales alimentos de juveniles de *M. curema* es el zooplancton, la dieta de las especies del género *Mugil* de acuerdo con Santini *et al.*, (2015) ha sido la misma desde el Paleógeno por lo que si una alta cantidad de haplotipos de Alvarado fuera explicada por la disponibilidad de alimento actualmente la localidad de Sabancuy, Campeche debería presentar también un alto número de haplotipos, pero el régimen de lluvias y vientos actual no se estableció sino hasta hace 11, 000 años por lo que la disponibilidad de alimento pudo haber sido diferente en el pasado aunque no se tienen referencias sobre la biomasa de zooplancton en el GM durante el Pleistoceno tardío podemos inferir que la laguna costera de Alvarado en el pasado presentaba una mayor biomasa de zooplancton e ictioplancton.

El alto número de haplotipos de Alvarado y Sisal también puede ser debido a mayor disponibilidad de hábitat propicio para la alimentación y crecimiento de las larvas, como lo son los manglares los cuales son un tipo de vegetación dominante en algunos estuarios y lagunas costeras del Golfo de México presentes desde el Eoceno (Berry, 1924, 1930) de acuerdo con la CONABIO (2009) son importantes zonas de crianza y alimentación para lisas y otros peces de importancia comercial. El área de la superficie

de los manglares podría darnos una idea de la disponibilidad de hábitat para las larvas y adultos de *M. curema*. A nivel nacional, Campeche es el estado que posee la mayor superficie de manglar, sin embargo, en el 2010 la laguna de Alvarado, Veracruz tenía una superficie de 14, 897 ha mayor que Sabancuy, Campeche de 12,858 ha. Por otro lado, Sisal presentó casi el doble de superficie que estas dos localidades con 24, 091 ha (CONABIO, 2009), por lo que esto puede explicar por qué las localidades de Alvarado y Sisal tienen una mayor variación haplotípica a diferencia de las otras localidades. Si bien no se tienen datos sobre la cobertura de los manglares en el Golfo de México durante el Pleistoceno, podemos inferir que tanto la disponibilidad de hábitat y alimento fue mayor en Alvarado y Sisal en el pasado.

9.4 Estructura genética poblacional en el Pacífico mexicano

Dentro del haplogrupo del Pacífico Mexicano, los análisis filogenéticos, genealógicos, AMOVA ($F_{ST}=0.95$) y de distancia genética (1.6%) soportaron una subdivisión en Pacífico norte y Pacífico sur, con un tiempo de divergencia más reciente (0.4 ma). Esto podría ser resultado de cambios oceanográficos del Pleistoceno posteriores al cierre del Istmo de Panamá. Estos cambios oceanográficos incluyen variaciones en el nivel del mar, temperatura y salinidad, así como la intensificación de la corriente costera de Costa Rica y la de California, las cuales podrían haber separado los linajes de *M. curema* en dos regiones Pacífico transicional mexicano (PM norte) y Pacífico centroamericano (PM sur) (Briggs, 1995; McMahan *et al.*, 2013).

Estos resultados sugieren que PM norte y sur son linajes mitocondriales intraespecíficos de acuerdo al criterio interespecífico general de Ward *et al.* (2009), Hebert *et al.* (2010) y April *et al.* (2011), quienes mencionan que se requiere al menos de 2-2.8% de distancia genética para proponer una especie críptica de pez; mientras que Durand & Borsa (2015) sugieren una diferenciación de 3.2-5.4% para *M. curema*, usando secuencias mitocondriales del gen citocromo oxidasa I. Por lo tanto se confirma la propuesta de un nuevo linaje mitocondrial intraespecífico para el PM norte a la costa este del Pacífico con base en la distribución actual de los linajes por Durand *et al.* (2012a), Durand & Borsa, (2015) y Durand *et al.* (2016).

Como se había mencionado anteriormente, la divergencia entre los dos linajes del Pacífico mexicano pudo haberse dado durante la configuración de las corrientes en el Pleistoceno las cuales a su vez generaron una división biogeográfica (Tellier *et al.*, 2009, Zakas *et al.*, 2009, Brante *et al.*, 2012). El patrón de corrientes del Pacífico mexicano se estableció entre 350,000 a 400, 000 años después del cierre de la comunicación oceánica entre el Pacífico mexicano y el Caribe hace 2.8 ma (Coates *et al.*, 2005, O’Dea *et al.*, 2007), por lo tanto el linaje del pacífico mexicano norte esta separado del linaje del sur por la corriente de California (CC) que pertenece a la ecorregion marina del Pacífico transicional mexicano (PTM) y la corriente norecuatorial (CNE) y costera de Costa Rica (CCR) a la región del Pacífico centroamericano (PC) (Wilkinson *et al.*, 2009).

Es posible observar una estructura genética poblacional similar en otro tipo de fauna marina como en el pepino de mar *Holothuria inornata* en el cual se encontró una

marcada estructura genética entre la región mexicana que incluye las localidades de Sinaloa, Jalisco, Michoacán y Guerrero y la región panámica frente a las costas de Chiapas, El Salvador, Panamá y Perú, utilizando secuencias del gen citocromo oxidasa I (Prieto- Rios *et al.*, 2014). En este estudio se concluyó que la separación era debida a las corrientes que impedían el intercambio larvario.

En cuanto a los individuos de Oaxaca dentro del linaje del GM, pueden existir dos explicaciones: 1) Las mutaciones que se fijaron en el tiempo son insuficientes y aún comparten polimorfismos ancestrales, 2) Hubo o existe una ruta por el Istmo de Tehuantepec que conectó el Océano Pacífico y Atlántico debido a cambios en el nivel del mar durante el Pleistoceno que impidió la diferenciación genética de los individuos de Oaxaca con los del Golfo de México.

En el primer caso el Golfo de Tehuantepec puede ser una potencial barrera para el flujo de genes y por lo tanto para el intercambio larvario entre las regiones del PTM y PC. De acuerdo con Prieto-Ríos *et al.* (2014) esta es una zona que ha merecido muchos estudios debido a sus características particulares como el patrón de vientos que influyen en las estructuras oceanográficas a mesoescala como los giros, remolinos y surgencias las cuales afectan la direccionalidad de la CNE y CCR. Estas características del Golfo de Tehuantepec pueden haber provocado que los individuos de la localidad de Oaxaca no se mezclarán con las otras localidades del Pacífico mexicano, al ser una barrera para el intercambio de genes estos aún conservan polimorfismos ancestrales del clado basal del Golfo de México. Es interesante observar que en el caso de *Holothuria inornata* los resultados son similares, los individuos de

Puerto Ángel, Oaxaca son genéticamente muy diferentes a los de la región mexicana y panámica, sugiriendo que esta diferenciación genética se debió a la morfología y a la oceanografía única del Golfo de Tehuantepec.

El segundo supuesto se debe a que durante los ciclos interglaciares del Pleistoceno el nivel del mar se elevó, se alteraron los patrones de drenaje de las cuencas, algunos ríos se interconectaron y se formaron grandes lagos por el aumento de temperatura después del cierre del Istmo de Panamá hace 2.8 ma (Briggs, 1995; Bermingham & Avise, 1986) provocando la anastomosis de los ríos mesoamericanos, por ejemplo durante el período tardío del Pleistoceno, un lago natural cubrió lo que actualmente es la Presa de Valsequillo, Puebla (Gonzales *et al.*, 2006).

Por lo tanto la anastomosis o la conexión de múltiples canales que rodearon cuencas de inundación conectaron al PM con el GM, favoreciendo la conexión de ejemplares de Oaxaca con los del GM, aunque no existen evidencias de la conexión en el Pleistoceno de alguna cuenca de inundación entre el Golfo de Tehuantepec y el Golfo de México. En el presente es posible que los ríos Coatzacoalcos-Tehuantepec, a través del paso de Chivela y el Grijalva-Usumacita desemboquen en el Sistema Lagunar Huave, y conecten poblaciones de peces dulceacuicolas entre las dos vertientes de México (Smith & Bermingham, 2005, Hulsey & López-Fernández, 2011). Existen evidencias de que en el centro de México hubo grandes conexiones fluviales o lacustres con cuencas interiores durante el Pleistoceno por ejemplo entre el río Pánuco y el Lerma que conectó poblaciones de goodeidos (Guzmán, 2015), los cuales son capaces de desplazarse cientos de kilómetros hacia ríos, lagos y corrientes. *M.*

curema tiene la característica de soportar el agua dulce y de desplazarse a grandes distancias. Rodiles-Hernández *et al.*, (2005) reportan juveniles de *M. curema* a 700 km costa adentro en el río Lacantún, Chiapas el cual es perteneciente a la cuenca de los ríos Grijalva-Usumacinta. Es posible inferir que tanto en el pasado como en el presente los individuos de Oaxaca mantiene el flujo genético con las localidades del Golfo de México a través de la conexión de las subcuencas: RH29Ba del río Coatzacoalcos, RH29Bk del río Oaxaca, RH30Ei del río Suchiapa, RH30Eg del río Cintapala, RH30Ef del río Encajonado y RH30EI del río Santo Domingo (INEGI, 2017).

De las dos posibles explicaciones para comprender la similitud genética de los individuos de Oaxaca con los del Golfo de México, la conexión pasada y actual entre las subcuencas del GM y PM parece ser la más adecuada debido a que en los análisis merísticos y de microsatélites se obtuvieron resultados similares y a que en el presente está comprobado que el Istmo de Tehuantepec es una vía indudable para el movimiento de peces de agua dulce del Atlántico al Pacífico por medio de la conexión de los ríos Coatzacoalcos-Tehuantepec y Grijalva-Usumacinta los cuales son zonas de grandes inundaciones y probablemente han sido la causa de la mezcla de las comunidades acuáticas evitándose de esta manera la diferenciación de linajes.

Es importante mencionar que un análisis merístico de las localidades de estudio elaborado por la Dra. Ana Laura Ibáñez Aguirre (Comm. Pers.) da robustez a los resultados obtenidos para Oaxaca, debido a que la frecuencia de escamas de la línea lateral de los individuos de Oaxaca es similar también con los individuos del Golfo de México (Fig. 8), a demás de los datos obtenidos con microsatélites por Pacheco-

Almanzar (en preparación) donde los individuos de Oaxaca son genéticamente diferentes a los del PM.

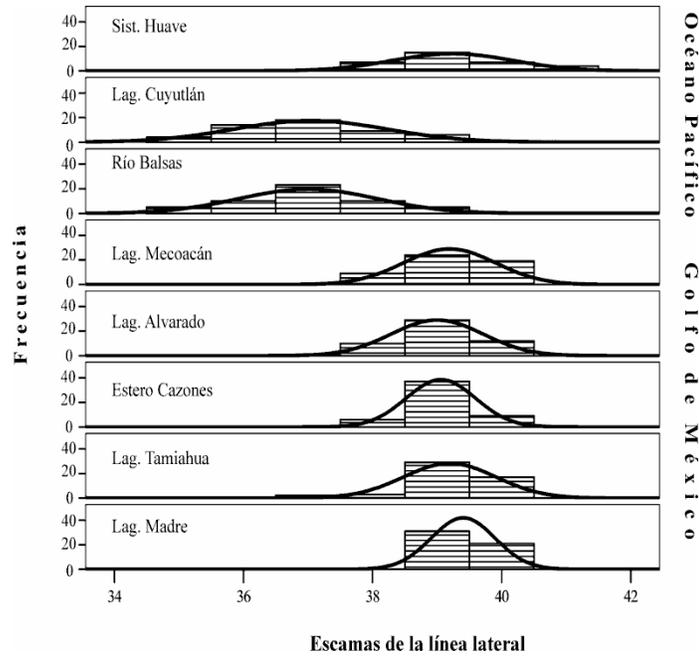


Fig. 8. Frecuencia de la serie lateral de escamas de localidades del GM y PM. Tomado de Ibáñez (en preparación).

Estos resultados merísticos, reflejan la necesidad de realizar estudios de morfometría geométrica entre los individuos de las diferentes localidades estudiadas, que aunados a los datos presentados en esta tesis, ayuden al entendimiento de la historia evolutiva de esta especie.

X. CONCLUSIONES

- 1). Los análisis de AMOVA, redes haplotípicas, distancias genéticas y relaciones filogenéticas sugieren la presencia de dos haplogrupos, uno en GM, correspondiente al linaje T2 considerado el verdadero linaje de *Mugil curema*, y la localidad de Oaxaca, y otro en la vertiente del Pacífico (con excepción de Oaxaca), que podrían representar dos especies crípticas.
- 2). La presencia de Oaxaca dentro del linaje del GM puede deberse a una conexión pasada o reciente por medio de la inundación de subcuencas en el Istmo de Tehuantepec o a que los individuos de esta localidad conservan polimorfismos ancestrales del linaje basal del GM.
- 3). La separación de estos dos haplogrupos, GM y PM data de hace 1.5 ma coincidiendo con el cierre del Istmo de Panamá.
- 4). El haplogrupo del PM muestra a su vez una subdivisión en un grupo norte y un grupo sur, con separación hace 0.4 ma que podría ser resultado de una combinación de factores y cambios oceanográficos del Pleistoceno posteriores al cierre del Istmo de Panamá.
- 5). De acuerdo con los resultados obtenidos la marcada diferenciación y estructuración genética entre los linajes del Golfo de México y Pacífico mexicano, confirma la eficacia del código de barras de la vida (COI) para la identificación de especies crípticas de *Mugil curema*. En todos los análisis realizados se observó robustez y consistencia.
- 6). Los tiempos de divergencia coinciden con los obtenidos para otros peces marinos y dulceacuícolas para los cuales el cierre total del Istmo de Panamá fue también el

evento vicariante más importante que separó las poblaciones de peces en dos regiones: Océano Pacífico y Atlántico.

XI. PERSPECTIVAS

El reto para los próximos estudios moleculares de *M. curema* es corroborar la conexión actual entre las poblaciones de Oaxaca y el Golfo de México, así como la posible presencia de más linajes crípticos en el Pacífico mexicano y analizar los factores causantes de esta divergencia genética. Así, se requiere un mayor muestreo en toda

la distribución de la especie en el PM, diferentes marcadores mitocondriales y nucleares con una alta tasa mutacional, análisis morfológicos y morfométricos que corroboren estas hipótesis.

Debido a la variabilidad morfométrica, las diferentes temporadas de desove y los resultados de microsatélites ya reportados, las poblaciones del GM de *M. curema* están formando diferentes grupos o linajes por lo que sería importante utilizar un marcador mitocondrial con una mayor tasa de mutación (e.g. región control) que confirmen la presencia de un solo linaje o la formación de más grupos.

Por otro lado, sería importante tener una visión más amplia sobre el origen y diversificación de *M. curema* para lo cual sería necesario un muestreo más amplio a lo largo de toda su área de distribución y la obtención de los tiempos de divergencia para todos los linajes reportados hasta el momento.

Debido a que *M. curema* es una especie de importancia comercial, resulta necesario plantear unidades de conservación genética (unidades evolutivamente significativas y unidades de manejo) que permitan proponer un Plan de Acción de Conservación de la especie a escala regional o de país.

XII. LITERATURA CITADA

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Molecular Biology*, 215(1): 403-410.

Álvarez-Lajonchere, L. 1982. The fecundity of mullet (Pisces: Mugilidae) from Cuba waters. *Journal of Fish Biology*, 21(1): 607-613.

- Anderson, W.W. 1957. Early development, spawning, growth, and occurrence of the silver mullet (*Mugil curema*) along the south Atlantic coast of the U.S. *Fish Wildlife*, 57(1): 397-414.
- Anderson, W.W. 1958. Larval development, growth and spawning of striped mullet along South Atlantic coast of U.S. *Fish Wildlife*, 58(1): 501-519.
- April J., Mayden, R.L., Hanner, R.H. & Bernatchez, L. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 108: 10602–10607.
- Arroyo- Cabrales, J., Carreño, A.L., Lozano-García, S. & Montellano-Ballesteros, M. 2008. La diversidad en el pasado. En: Capital natural de México, vol. I edits. *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México. 227-262 p.
- Arnold, E.L & Thompson, J.R. 1958. Offshore spawning of the striped mullet, *Mugil cephalus*, in the Gulf of Mexico. *Copeia*, 158(1): 130-132.
- Astorga, M. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En: Lovatelli, A., Farías, A. & Uriarte, I. edits. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. *Actas de pesca y acuicultura*. Food and Agriculture Organization, Puerto Montt. 277-287 p.
- Aurelle, D., Barthelemy, R.M., Quignard, J.P., Trabelsi, M. & Faure, E. 2008. Molecular Phylogeny of Mugilidae (Teleostei:Perciformes). *The open marine biology*, 2(1): 29-37.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 684 p.
- Bacon, C.D., Silvestro, D., Jaramillo, C., Smith, B.T., Chakrabarty, P. & Antonelli, A. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the

- isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 112: 6110–6115.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Bermingham, E. & Avise, J. C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113: 939–965.
- Berry, E. W. 1924. The middle and upper Eocene floras of southern North America. *Geological Survey professional paper*, 92: 1-206.
- Berry, E. W. 1930. Revision of the lower Eocene Wilcox Flora of the southern United States. *Geological Survey professional paper*, 156: 1-196.
- Beu, A.G. 2001. Gradual Miocene to Pleistocene uplift of the Central American isthmus: Evidence from tropical American Tonnoidean gastropods. *Journal of Paleontology*, 75(3): 706-720.
- Blaber, S.J.M. 2000. Tropical estuarine fishes: ecology, exploitation and conservation. Blackwell Science, Oxford, 372 p.
- Bonner, T.H. 2007. *Identification and information for Texas fish*. [En línea] Disponible en: <http://www.fishesoftexas.org/home/> [Último acceso: 28 Mayo 2017].
- Brand, L.E. 1989. Review of genetic variability in marine phytoplankton species and the ecological implications. *Biological Oceanography*, 6: 397-409.
- Brante, A., Fernández, M. & Viard, F. 2012. Phylogeography and Biogeography Concordance in the Marine Gastropod *Crepidatella dilatata* (Calyptraeidae) along the Southeastern Pacific Coast. *Journal of Heredity*, 103 (5): 630-637.
- Briggs, J.C. 1995. Global Biogeography. Developments in Paleontology and Stratigraphy, Vol. 14. Elsevier, Amsterdam. 473 p.

- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 91: 649-6495.
- Cabral-Solís, E.G. 1999. Estudio sobre el crecimiento y aspectos reproductivos de la lebrancha *Mugil curema* Cuvier y Valenciennes, 1836, en la laguna de Cuyutlán, Colima. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de Colima, 91 pp.
- Cabral-Solís, E.G., Gallardo-Cabello, M., Espino-Barr, E. & Ibáñez, A.L. 2010. Reproduction of *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) from the Cuyutlán lagoon, in the Pacific coast of México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 14(3): 19-32.
- Caldara, F., Bargelloni, L., Ostellari, L., Penzo, E., Colombo, L. & Patarnello, T. 1996. Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: evidence of a differential rate of evolution at the intrafamily level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6: 416–424.
- Caldwell, D.K. & Anderson, W.W. 1959. Offshore occurrence of larval silver mullet, *Mugil curema*, in the western Gulf of Mexico. *Copeia*, 1959(1): 252.
- Cardona, L. 2016. Food and Feeding of Mugilidae. En: Crosetti, D. & Blaber, S.J.M., edits. *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*. CRC Press, Boca Raton, 165-195 p.
- Carvalho, G. R. & Hauser, L. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews of Fish Biology and Fisheries*, 4: 326-350.
- Castillo-Olguín, E., Uribe-Alcocer, M. & Díaz-Jaimes, P. 2012. Evaluación de la estructura genética poblacional de *Sphyrna lewini* para la identificación de unidades de conservación en el Pacífico mexicano. *Ciencias marinas*, 38(4): 635-652.
- Chang C.W., Iizuka, Y. 2012. Estuarine use and movement patterns of seven sympatric

- Mugilidae fishes: the Tatu Creek estuary, central western Taiwan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 106:121–126.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(1): 1657-1659.
- Coates, A.G., McNeill, D.F., Aubry, M.P., Berggren, W.A. & Collins, L.S. 2005. An introduction to the geology of the Bocas del Toro archipelago, Panama. *Caribbean Journal Science*, 41: 374–391.
- Colborn, J., Crabtree, R.E., Shaklee, J.B., Pfeiler, E. & Bowen, B.W. 2001. The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula spp.*): Cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution*, 4: 807-820.
- CONABIO. 2009. Manglares de México: Extensión y distribución. 2ª ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 99 pp.
- Darriba, D., Taboada, G.L, Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.
- Denys, G.P.J., Geiger, M.F., Persat, H. & Dettai, A. 2015. Invalidity of *Gasterosteus gymnurus* (Cuvier, 1829) (Actinopterygii, Gasterosteidae) according to integrative taxonomy. *Cybium*, 39(1): 37-45.
- DeSalle, R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology*, 20(5): 1545-1547.
- Ditty, J.G. & Shaw, R.H. 1996. Spatial and temporal distribution of larval striped mullet (*Mugil cephalus*) and white mullet (*Mugil curema*, family: Mugilidae) in the northern Gulf of Mexico, with notes on mountain mullet, *Agonostomus monticola*. *Bulletin of Marine Science*, 59: 271-288.
- Dobzhansky, T. 1972. Species of *Drosophila*. *Science*, 177(4050):664-669.

- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969-1973.
- Durand, J.D., Shen, K.N., Chen, W.J., Jamandre, B.M., Blel, H., Diop, K., Nirchio, M., García de León, F.J., Whitfield, A.K., Chang, C.W. & Borsa, P. 2012a. Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology based taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1): 73-92.
- Durand, J.D., Chen, W.J., Shen, K.N., Fu, C. & Borsa, P. 2012b. Genus-level taxonomic changes implied by the mitochondrial phylogeny of grey mullets (Teleostei: Mugilidae). *Comptes Rendus Biologies*, 335(1): 687–697.
- Durand, J.D. & Borsa, P. 2015. Mitochondrial phylogeny of grey mullets (Acanthopterygii: Mugilidae) suggests high proportion of cryptic species. *Comptes Rendus Biologies*, 338: 266–277.
- Durand, J.D., Hubert, N., Shen, K. N. & Borsa, P. 2016. DNA barcoding grey mullets. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 27: 233-243.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1.
- Excoffier, L., Smouse, P.E & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(1): 479-491.
- Felsenstein, J. 1973. Maximum Likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic and Zoology*, 22(1): 240-249.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

- Finucane, J.E., Collins, L.A. & Barger, L.E. 1978. Spawning of the striped mullet, *Mugil cephalus*, in northwestern Gulf of Mexico. *Northeast Gulf Science*, 2(1): 148-150.
- Fraga, E., Schneider, H., Nirchio, M., Santa-Brigida, E., Rodrigues-Filho, L.F. & Sampaio, I. 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae: Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 598–604.
- Galván-Quesada, S., Doadrio, I., Alda, F., Perdices, A., Reina, R.G., García-Varela, M., Hernández, N., Campos-Mendoza, A., Bermingham, E. & Domínguez-Domínguez, O. 2016. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Amphidromous Fish Genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). *PLoS ONE*, 11(4): e0153538.
- Geller, J.B., Darling, J.A. & Carlton, J. 2010. Genetic perspectives on marine biological invasions. *Marine Science*, 2(1): 367-393.
- Goloboff, P. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics*, 15: 415–428.
- Gonzalez, S., Huddart, D. & Bennett, M. 2006. Valsequillo Pleistocene Archaeology and Dating: Ongoing Controversy in Central Mexico. *World Archaeology*, 38(4): 611-627.
- Guevara–Chumacero, L.M & Sainoz–Aguirre, A. 2012. Especies crípticas: Diferentes especies con una misma forma. *Ciencia y desarrollo*, 38(258): 6-13.
- Guzmán, A.F. 2015. El registro fósil de los peces mexicanos de agua dulce. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(3): 661-673.
- Hall, T.A. 1999. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids*, 41(1): 95-98.
- Hallam, A. 1981. Relative Importance of Plate movement, Eustasy, and Climate in Controlling Major Biogeographical Changes Since the Early Mesozoic. En:

- Nelson, G. & Rosen, D.E., edits. *Vicariance Biogeography: A critique*. Columbia University, New York.
- Harrison, I.J. & Senou, H. 1999. Order Mugiliformes, Mugilidae. En: Carpenter, K.E. & Niem, V.H., edits. *The Living Marine Resources of the Western Central Pacific, Vol. 4: Bony Fishes part 2 (Mugilidae to Carangidae)*. *Identification Guide for Fishery Purpose*. Food and Agriculture Organization, Rome, 2069-2108 p.
- Harrison, I.J. 2002. Order Mugiliformes, Mugilidae. En: Carpenter, K.E., ed. *The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic, Vol. 2: Bony Fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae)*. *Identification Guide for Fishery Purpose*. Food and Agriculture Organization, Rome, 1071–1085 p.
- Harrison, I.J., Nirchio, M., Oliveira, C., Ron, E. & Gaviria, J. 2007. A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *Journal of Fish Biology*, 71(1): 76-97.
- Harwin, R.M. 2010. The concept of sibling species. *Ostrich: Journal of African Ornithology*, 40(1): 27-32.
- Hasegawa, M., Iida, Y., Yano, T., Takaiwa, F. & Iwabuchi, M. 1985. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 22(1): 32-38.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. & Waard, R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B.*, 270(1512): 313-321.
- Hebert, P., Dewaard, J.R. & Landry, J.F. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters* 6: 359–362.
- Heras, S., González-Castro, M. & Roldan, M.I. 2006. *Mugil curema* in Argentinean waters: combined morphological and molecular approach. *Aquaculture*, 261: 473–478.

- Heras, S., González-Castro, M. & Roldán, M.I. 2008. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Journal of Fish Biology*, 2(1): 1-15.
- Hey, J., Nielsen, R. 2004. Multilocus Methods for Estimating Population Sizes, Migration Rates and Divergence Time, With Applications to the Divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, 167(2): 747-760.
- Hoese, H.D. 1965. Spawning of marine fishes in the Port Aransas, Texas, area as determined by the distribution of young and larvae. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin, Texas, 144 p.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N., Taylor, E., Burrdge, M. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE*, 3(6): 2490-2497.
- Hulsey, C. & López-Fernández, H. 2011. Nuclear Central America. En: Albert, J. & Reis, R., edits. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press, 279-292 p.
- Ibáñez, A.L. & Leonart, J. 1996. Relative growth and comparative morphometrics of *Mugil cephalus* L. y *Mugil curema* V. in the Gulf of Mexico. *Science Marine*, 60(1): 361-368.
- Ibáñez, A.L. & Gallardo-Cabello, M. 2004. Reproduction of *Mugil cephalus* and *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) from coastal lagoon in the Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 75(1): 37-49.
- Ibáñez, A.L. & Gallardo-Cabello, M. 2005. Identification of two Mugilidae species, *Mugil cephalus* and *Mugil curema* (Pisces:Mugilidae), using the ctenii of their scales. *Bulletin of Marine Science*, 77(2): 305-308.
- Ibáñez, A.L., Cabral-Solís, E., Gallardo-Cabello, M. & Espino-Barr, E. 2006. Comparative morphometrics of two population of *Mugil curema* in the Atlantic and Pacific coasts. *Science Marine*, 70(1): 139-145.

- Ibáñez, A.L. & Colín, A. 2014. Reproductive biology of *Mugil curema* and *Mugil cephalus* from western Gulf of Mexico waters. *Bulletin of Marine Science*, 90(4): 941-952.
- INEGI. 2017. Red Hidrográfica escala 1:50 000 edición 2.0 – descarga. Recuperado de: <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/reclnat/hidrologia/descarga.aspx>.
- Inman, D.L. & Nordstrom, C.E. 1971. On the Tectonic and Morphologic Classification of Coasts. *The Journal of Geology*, 79(1): 1-21.
- Iturralde-Vinent, M. 2004. Chapter 3: The conflicting paleontologic versus stratigraphic record of the formation of the Caribbean Seaway. En: Bertolini, C., Buffler, R. & Blickwede, J., edits. *The Gulf of Mexico and Caribbean region: Hydrocarbon ecosystems, basin formation and plate tectonics*. American Association Petroleum Geologists. Memoire, 79, 75-88 p.
- Jacot, A.P. 1920. Age, growth and scales characters of the mullet *Mugil cephalus* and *Mugil curema*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 39 (1): 199-230.
- Kessler, W.S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: a review. *Progress in Oceanography*, 69(2-4): 181-217.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kinlan, B.P. & Gaines, S.D. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, 84 (8): 2007-2020.
- Kon, T., Yoshinto, T., Mukai, T. & Nishida, M. 2007. DNA sequences identify numerous cryptic species of vertebrate: a lesson from the gobioid fish *Schindleria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 53-62.
- Kotel'nikov, A.E., D'yakonov, V.V., Romero, B.E. & Usova, V.M. 2014. Formación del Golfo de México y la península de Florida. *Rudn Journal of Engineering*

- Researches*, 3:114 – 118.
- Kress, W.J. & Erickson, D.L. 2008. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 2761–2762.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–1874.
- Lara-Lara, J.R., Arenas Fuentes, V., Bazán Guzmán, C., Díaz Castañeda, V., Escobar Briones, E., García Abad, M.C., Gaxiola Castro, G., Robles Jarero, G., Sosa Ávalos, R., Soto González, L.A., Tapia García, M. & Valdez-Holguín, J.E. 2008. Los ecosistemas marinos. En: Sarukhán, J. *et al.*, edits. *Capital natural de México. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad, México*. CONABIO, 135-159 p.
- Larson, E.T. & Shanks, A.L. 1996. Consumption of marine snow by two species of juvenile mullet and its contribution to their growth. *Marine Ecology Progress Series*, 130: 19–28.
- Lebreton, B., Richard, P., Parlier, E.P., Guillou, G. & Blanchard, G.F. 2011. Trophic ecology of mullets during their spring migration in a European saltmarsh: a stable isotope study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91: 502–510.
- LeGrande, W.H. & Fitzsimons, J.M. 1976. Karyology of the mullets *Mugil curema* and *Mugil cephalus* Perciformes: Mugilidae Louisiana. *Copeia*, 1976(2): 388-391.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lopera-Barrero, P., Jayme, A.P., Ribeiro, R., Gomes, P., Jacometo, C.B., & Silva Lopes, T. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1): 77-86.

- Luna, E., Guerrero, J.A. & Chew-Taracena, T. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*, 15(3): 351-370.
- Maia, R.C. & Vilela do Nascimento, I. 1980. Reproduction of the white mullet *Mugil curema* Valenciennes, 1863, in estuarine waters of Pernambuco, Brazil. First Brazilian Symposium of Aquaculture, 205-212 p.
- Manooch, C.S. & Mason, D.L. 1984. Age, growth and mortality of lane snapper from Southern Florida. *Northeast Gulf Science*, 7: 109-115.
- Mayr, E. 1969. Principles of Systematic Zoology. New York: McGraw-Hill, 475 p.
- McMahan, C.D., Matthew, P.D., Domínguez-Domínguez, O., García-de-León, F.J., Doadrio, I. & Piller, K.R. 2013. From the mountains to the sea: phylogeography and cryptic diversity within the mountain mullet, *Agonostomus monticola* (Teleostei: Mugilidae). *Journal of Biogeography*, 40: 894–904.
- Medlin, L. K. 1995. Genetic variability and phytoplankton species. En: Pierrot-Bults, A.C & Van der Spoel, S., edits. Pelagic Biogeography ICoPB II. Proceedings of the 2nd International Conference. Final report of scor/ioc working group 93 “Pelagic Biogeography”, Noordwijkerhout, The Netherlands, 9 July-14 July 1995, Intergovernmental Oceanographic Commission Workshop Report 142, 257-265 p.
- Menezes, N., Nirchio, M., Oliveira, C. & Siccha-Ramirez, R. 2015. Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America with integration of the morphological, cytogenetic and molecular data. *Zootaxa*, 3918: 001–038.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D.F., Husmeier, D. & McCuire, G. 2004. TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics*, 20: 1806–1807.

- Monreal-Gómez, M.A., Salas de León, D.A. & Gracia, A. 2004. Golfo de México, circulación y productividad. *Ciencias*, 76: 24-33.
- Montes, C., Cardona, A., McFadden, R., Morón, S.E., Silva, C.A., Restrepo-Moreno, S., Ramírez, D.A., Hoyos, N., Wilson, J., Farris, D., Bayona, J.A., Jaramillo, C.A., Valencia, V., Bryan, J. & Flores, J.A. 2012. Evidence for middle Eocene and younger land emergence in central Panama: Implications for Isthmus closure. *Geological Society of America Bulletin*, 124(5-6): 780-799.
- Moore, R.H. 1974. General ecology distribution and relative abundance of *Mugil cephalus* and *Mugil curema* on the south Texas coast. *Science Marine*, 18(1): 241-245.
- Nirchio, M. & Cequea, H. 1998. Karyology of *Mugil liza* and *Mugil curema* from Venezuela. *Investigación marina costera*, 27(1): 45-50.
- Nirchio, M., Cervigón, F., Porto, J., Pérez, J.P., Gómez, J.A. & Villazaz, J.P. 2003. Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. *Scientia Marina*, 67(1): 113-115.
- Nirchio, M., Cipriano, R., Cestari, M. & Fenocchio, A. 2005. Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema*. *Neotropical Ichthyol*, 3(1): 107–110.
- Nirchio, M., Oliveira, C., Ferreira, I.A., Pérez, J.E., Gaviria, J.I., Harrison, I., Rossi, A.R. & Sola, L. 2007. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. *Comunicaciones Reports*, 32(11): 757-762.
- Nirchio, M. & Oliveira, C. 2014. Citogenética como herramienta taxonómica en peces. *Saber*, 26(4): 361-372.

- Nirchio, M., Oliveira, C., Siccha-Ramirez, R., Sene, V.F., Sola, L., Milana, V. & Rossi, A.R. 2017. The *Mugil curema* species complex (Pisces, Mugilidae): a new karyotype for the Pacific white mullet mitochondrial lineage. *Comparative cytogenetics*, 2(2): 225-237.
- Nixon, K.C. 1999–2002. WinClada ver. 1.0000 Published by the author, Ithaca, NY, USA.
- O’Dea A., Rodriguez, F., De Gracia, C. & Coates, A. 2007. La Paleontología marina en el Istmo de Panamá. *Canto Rodado*, 2:149–179.
- Okolodkov, Y.B., Aké-Castillo, J.A., Gutiérrez-Quevedo, M.G., Pérez-España, H. & Salas-Monreal, D. 2011. Annual cycle of the plankton biomass in the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, Soutwestern Gulf of Mexico. En: Kattel, G., ed. *Zooplankton and phytoplankton*. Nova Science Publishers, Hauppauge, 63-88 p.
- Pacheco-Almanzar, E. 2017. Conectividad entre poblaciones de *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) en el Golfo de México y Pacífico Mexicano. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Pacheco-Almanzar, E., Ramírez-Saad, H., Velázquez-Aragón, J.A., Serrato, A. & Ibáñez, A.L. 2017. Diversity and genetic structure of white mullet populations in the Gulf of Mexico analyzed by microsatellite markers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 198(A): 249-256.
- Paine, M., McDowell, J. & Graves, J. 2007. Specific identification of Western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science*, 80(2): 353-367.
- Peña, C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Revista peruana de biología*, 18(2): 265–267.

- Peregrino-Uriarte, A.B., Pacheco-Aguilar, R., Varela-Romero, A. & Yepiz-Plascencia, G. 2007. Differences in the 16SrRNA and cytochrome c oxidase subunit I genes in the mullets *Mugil cephalus* and *Mugil curema*, and snooks *Centropomus viridis* and *Centropomus robalito*. *Ciencias Marinas*, 33: 95–104.
- Pierrot-Bults, A.C. 1995. Intraspecific diversity in oceanic macrozooplankton. En: Pierrot-Bults, A.C. & Van der Spoel, S., edits. *Pelagic Biogeography ICoPB II. Proceedings of the 2nd International Conference*. Final report of scor/ioc working group 93 “Pelagic Biogeography”, Noordwijkerhout, The Netherlands, 9 July-14 July 1995. Intergovernmental Oceanographic Commission Workshop Report 142, 285-296 p.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*, 50(1): 580-601.
- Prieto-Ríos, E., Solís-Marin, F.A., Borrero-Pérez, G.H & Díaz-Jaimes, P. 2014. Filogeografía de *Holothuria* (Halodeima) *inornata* Semper, 1868 (Echinodermata: Holothuroidea). *Revista peruana de biología*, 21(2): 155-162 .
- Prothero, D.R., Ivany, L.C. & Nesbitt, E. 2003. From Greenhouse to Icehouse: The Marine Eocene-Oligocene Transition. Columbia University Press, New York, 541 p.
- Queiroz, K. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879–886.
- Render, J.H., Thompson, B.A. & Allen, R.L. 1995. Reproductive development of striped mullet in Louisiana estuarine waters with notes on the applicability of reproductive assessment methods for isochronal species. *Fishes Society*, 124(1): 126-136.
- Rodiles-Hernández, R., González-Díaz, A. & Chan-Sala, C. 2005. Lista de Peces Continentales de Chiapas, México. *Hidrobiológica*, 15(2): 245-253.

- Rodrigues-Filho, L.F., Bruno da Cunha, D., Vallinoto, M., Schneider, H., Sampaio, I. & Fraga, E. 2011. Polymerase chain reaction banding patterns of the 5SrDNA gene as a diagnostic tool for the discrimination of South American mullets of the genus *Mugil*. *Aquaculture Research*, 42: 1117-1122.
- Rossi, A., Gornung, E., Sola, L. & Nirchio, M. 2005. Comparative molecular cytogenetic analysis of two congeneric species, *Mugil curema* and *Mugil liza* (Pisces, Mugiliformes), characterized by significant karyotype diversity. *Genética*, 125(1): 27-32.
- Rossi, A., Crosetti, D. & Livi, S. 2016. Genetics of Mugilidae. En: Crosetti, D. & Blaber, S.J.M., edits. *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*. CRC Press, Boca Raton, 349–397 p.
- Salvador, A. 1991. The Gulf of Mexico Basin. Geological Society of America, The Geology of North America, 568 p.
- Sánchez-Velasco, L., Flores-Coto, C. & Shirasago, B. 1996. Fish larvae abundance and distribution in the coastal zone off Terminos Lagoon, Campeche (Southern Gulf of Mexico). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 43: 707-721.
- Santini, F., Michael, R., May, G., Carnevale, B. & Moore, R. 2015. Bayesian Inference of Divergence Times and Feeding Evolution in Grey Mulletts (Mugilidae). *PLoS ONE*, bioRxiv 019075.
- Sanvicente-Añorve L. 1990. Comunidades ictioplanctónicas en el suroeste del Golfo de México. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 60 pp.
- Shen, K.N., Jamandre, B.W., Hsu, C.C., Tzeng, W.N. & Durand, J.D. 2011. Plio-Pleistocene sea level and temperatura fluctuations in the northwestern Pacific promoted speciation in the globally distributed flathead mullet *Mugil cephalus*. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 83.
- Siccha-Ramirez, R., Menezes, N.A. & Nirchio, M. 2014. Molecular Identification of Mullet: Species of the Atlantic South Caribbean and South America and the

- Phylogeographic Analysis of *Mugil liza*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 22(1): 86-96.
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60: 73-76.
- Smith, S.A. & Bermingham, E. 2005. The biogeography of lower Mesoamerican freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 32(10): 1835-1854.
- Sotka, E.E., Wares, J.P, Barth, J.A, Grosberg, R.K & Palumbi, S.R. 2004. Strong Genetic Clines and Geographical Variation in Gene Flow in the Rocky Intertidal Barnacle *Balanus Glandula*. *Molecular Ecology*, 13 (8): 2143-56.
- Steinke, D., Zemlak, T.S. & Hebert, P. 2009. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS ONE*, 4(7): e6300.
- Tellier, F., Meynard, A.P., Correa, J.A., Faugeron, S. & Valero, M. 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53 (3): 679-93.
- Terry, A., Bucciarell, G. & Bernardi, G. 2000. Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific Ocean and sea of cortex populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution*, 54: 652–659.
- Trape, S., Blel, H., Panfili, J. & Durand, J.D. 2009. Identification of tropical Eastern Atlantic Mugilidae species by PCR-RFLP analysis of mitochondrial 16SrRNA gene fragments. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 512–518.
- Urho L. 1999. Relationship between dispersal of larvae and nursery areas in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 56: 114-121.
- Vasconcelos-Pérez, J.; Sánchez-González, S. & Schultz-Ruiz, L. 1996. La pesquería de lisa. En: Sánchez-Palafox, A.; Fuentes-Castellanos, D.F. & García-Real,

- edits. *Pesquerías Relevantes de México. XXX Aniversario del INP*. Instituto Nacional de la Pesca, San Luis Potosí: SEMARNAP, 1100 p.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites, D.R. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibian. *Frontiers in Zoology*, 2: 1-12.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R & Hebert, P. 2005. DNA Barcoding of Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 360(1): 1847-1857.
- Ward, R.D., Hanner, R. & Hebert, P. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74: 329–356.
- Whitfield, A.K., Panfili, J. & Durand, J.D. 2012. A global review of the cosmopolitan flathead mullet *Mugil cephalus* Linnaeus 1758 (Teleostei: Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 641–681.
- Wilkinson, T., Wiken, E., Bezaury, J., Hourigan, T., Agardy, T., Herrmann, H., Janishevski, L., Madden, C., Morgan, L. & Padilla, M. 2009. Ecorregiones marinas de América del Norte. Comisión para la Cooperación Ambiental: Montreal, 200 p.
- Zakas, C., Binford, J., Navarrete, S.A & Wares, J.P. 2009. Restricted gene flow in Chilean barnacles reflects an oceanographic and biogeographic transition zone. *Marine Ecology Progress Series*, 394 (11): 165-77.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7: 203–14.
- Zinger, L., Gobet, A. & Pommiers, T. 2012. Two decades of describing the unseen majority aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology*, 21 (1):188-189.

XIII. ANEXO 1. Secuencias obtenidas del GenBank.

Accesos GenBank	Especímen/ Voucher	Gen	Procedencia	Referencia
JQ060560	371b	COI	Chiapas, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JX185178	LBP6066 30105	COI	Brasil	Siccha-Ramírez <i>et al.</i> , 2014
JQ060607	306	COI	Belice	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060610	NMR-56496	COI	Uruguay	Durand, <i>et al.</i> , 2012
KR862861	Ex71B8	COI	Georgia	Denys <i>et al.</i> , 2015
FJ582646		COI	Philippines, Manila	Steinke <i>et al.</i> , 2009

BIOUG<CAN>:HLC-
10821

JQ060586	404	COI	E.U.A	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060589	407	COI	Laguna Madre, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060594	419	COI	Belice	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060588	406	COI	La Paz, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060596	422	COI	Chiapas, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060599	425	COI	Chiapas, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060597	423	COI	Chiapas, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012
JQ060598	424	COI	Chiapas, México	Durand, <i>et al.</i> , 2012

ANEXO 2. Protocolo de Extracción con sales.

Lisis

Colocar la muestra de tejido o aleta en un tubo de 1.5 ml y dejar secar. Posteriormente agregar:

1. 410 µl de buffer de extracción (Tris-Base-HCl, NaCl, EDTA y agua destilada)
2. 90 µl de SDS al 10%
3. 15 µl de Proteinasa K [10 ng/ml]

Vortexear las muestras por cerca de un minuto e incubar por 2 o 3 horas a 55°C (puede quedar toda la noche).

Precipitación

Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min y conservar el sobrenadante. Agregar 200 µl de NaCl 5M y agitar hasta que homogenice. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min y nuevamente conservar el sobrenadante. Agregar 60 µl de Acetato de Sodio 3M y 650 µl de Isopropanol al 100%, frío e incubar a -20°C por dos horas (puede quedar toda la noche).

Lavado y resuspensión

Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min y conservar el pellet. Agregar 200 µl de etanol al 80% y mezclar por cerca de un minuto. Refrigerar por media hora.

Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos y conservar el pellet, secar a menos de 40°C por al menos una hora. Por ultimo resuspender el pellet con 50 µl de agua destilada. Se puede calentar unos minutos hasta que se disuelva el pellet y vortexear para mezclar. Conservar en refrigeración.

ANEXO 3. Protocolo de purificación con Sephadex.

1. Armar la columna Centri-Sep y agregar 750 µl de Sephadex a temperatura ambiente.
2. Esperar unos minutos en lo que se separan las fases.
3. Retirar la tapa inferior de la columna y pasar la columna a un tubo colector y esperar a que el Sephadex solidifique.

4. Tirar el agua que drene la columna y centrifugar a 2800 rpm durante 5 min.
5. Pasar la columna a un tubo de 1.5 mL previamente etiquetado.
6. Vaciar 20 μ l de producto de PCR en la columna correspondiente (si no se tiene 20 μ l, agregar el faltante de agua ultrapura inyectable y mezclar pipeteando) y centrifugar a 2800 rpm durante 5 min.
7. Desechar los residuos de Sephadex de la columna y almacenar el producto de PCR purificado a -20° C.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00161

Matricula: 2153803995

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES CRÍPTICAS DE *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) EN LAS COSTAS DE MÉXICO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 29 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO
DRA. JHOANA DIAZ LARREA
MTRO. HECTOR ESPINOSA PEREZ
DRA. ALEJANDRA SERRATO DIAZ



CONCEPCION LIZETTE AVILA HERRERA
ALUMNA

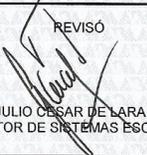
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA
DE: CONCEPCION LIZETTE AVILA HERRERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

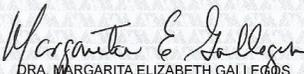
REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS MARTINEZ

PRESIDENTE



DR. LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO

VOCAL



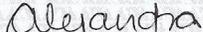
DRA. JHOANA DIAZ LARREA

VOCAL



MTRO. HECTOR ESPINOSA PEREZ

SECRETARIA



DRA. ALEJANDRA SERRATO DIAZ