



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**“Marcadores moleculares para la identificación  
de la sardina del Pacífico  
(*Sardinops sagax caeruleus*)”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias**

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)**

**Presenta**

**Ignacio Leyva Valencia**

La Paz, Baja California Sur, Abril del 2003

## RESUMEN

En México, la sardina del Pacífico nororiental (*Sardinops sagax caeruleus*) ha aportado más del 40% de la captura total nacional y más del 90% específicamente en el Golfo de California. La identificación de “stocks” y el conocimiento de su estructura, así como otros factores biológicos y ecológicos, son esenciales para desarrollar planes de manejo de los recursos pesqueros. La sistemática de este grupo se ha basado en gran medida en caracteres morfológicos, no obstante, algunas especies tropicales y subtropicales de clupeidos pueden ser difíciles de identificar, e incluso puede requerirse el empleo de microscopio y personal especializado. En el presente trabajo se analizó la aplicación de electroforesis de isoelectroenfoque (IEF) en cristalinas y de marcadores moleculares (de las subunidades ribosomales 12S y 16S), diseñados a partir de secuencias reportadas en *S. s. melanostictus*, como una alternativa para la identificación rápida y confiable de muestras de tejido y productos de desove de sardina monterrey (*S. s. caeruleus*). Los análisis de cristalinas mediante IEF, permitieron la identificación rápida a nivel de especie, sin embargo, con esta técnica no es posible discriminar entre stocks y su aplicación estaría limitada al análisis de juveniles y adultos. Por otra parte, los oligonucleótidos probados en este trabajo para ambas subunidades ribosomales (12S y 16S) permitieron la amplificación de secuencias parciales específicas, cuya homología fue casi idéntica entre las muestras de sardina monterrey y sardina japonesa. Además, se obtuvo un porcentaje de homología de 82% con otras familias, esta diferencia es suficiente para delimitar especies dentro de la familia Clupeidae con un alto grado de confianza. Aunque no fué posible probar ambos marcadores en muestras de huevos y larvas de *S.s.caeruleus*, los resultados obtenidos permiten visualizar un panorama positivo en la búsqueda de una estrategia para identificar de manera rápida y confiable muestras de productos de desove. Las secuencias obtenidas en este trabajo, representan el primer registro de secuencias de las subunidades ribosomales menor (12S) y mayor (16S) en la sardina del Pacífico (*S. s. caeruleus*) y la sardina crinuda (*Ophistonema libertate*).

Palabras clave: Sardina del Pacífico, secuencias ribosomales, identificación de especies.

---

**Dra. Norma Y. Hernández Saavedra.**

## ABSTRACT

In Mexico, the Pacific sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) contributed more than 40% of the capture in the Pacific and more than 90% in the Gulf of California. Identification of "stocks" and knowledge of its structure, as well as other biological and ecological factors, are essential for developing plans to handle this fishing resource. The taxonomy of this group has been based, to a great extent, on morphologic characteristics. Some clupeid species, with tropical and subtropical distribution, can be difficult to identify, and it may require the use of microscopy and specialized personnel. In this work, an isoelectric focusing technique (IEF) of ocular lens proteins (crystallines) and molecular markers (small 12S and large 16S ribosomal subunits) designed from sequences reported in *S. s. melanostictus*, an alternative for fast and reliable identification of tissue samples, eggs, and larvae of the monterrey sardine (*S. s. caeruleus*). The analyses of lens proteins by means of IEF allowed quick identification at species level. This technique does not discriminate between stocks, and its application would be limited to analyses of juveniles and adults. Oligonucleotides of ribosomal subunits (12S and 16S) allowed the amplification of specific partial sequences, whose homology was almost 100% between sardine samples (monterrey and japanese sardines). Additionally, homology of 82% with other genera was obtained, making possible the delimitation of species within the same genus, with a high degree of confidence. Although it was not possible to prove both markers in egg and larvae samples of *S. s. caeruleus*, the results obtained allow us to visualize a strategy to quickly and reliably identify egg and larvae samples. The sequences obtained in this work represent the first record of sequences of the small (12S) and large (16S) ribosomal subunits in the Pacific sardine (*S. s. caeruleus*) and crinuda sardine (*Ophistonema libertate*).

Key words: Pacific sardine, ribosomal sequences, species identification

---

**Dra. Norma Y. Hernández Saavedra.**

## DEDICATORIA

*A mis padres Margarita e Ignacio por el apoyo que me han dado en todos los sentidos, este logro es un pequeño reflejo del gran ejemplo que han sido en mi vida y del cual estoy orgulloso*

*A mis hermanas Ana, Gris y Ara su cariño y apoyo siempre lo tengo presente*

*A mi tío Mario, deseando que tengas éxito y sobre todo que seas feliz*

*A Delia, me has acompañado en los momentos difíciles, dándome todo sin pedir nada a cambio*

*A Norma y Arturo, entrañables amigos que me han apoyado y ayudado a madurar como persona*

## AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo fue parte del proyecto "Desarrollo y aplicación de herramientas moleculares para la evaluación y aprovechamiento de los recursos pesqueros y potenciales" (RP01). Agradezco a CONACYT por la beca otorgada (No. 158428), así como el apoyo recibido del programa de estudios de posgrado del CIBNOR*

*Gracias a la Dra. Norma Hernández por el apoyo que me ha brindado tanto en lo académico como en lo personal, por las facilidades que me dio para realizar mi trabajo, por su crítica siempre constructiva para mejorarlo y enriquecerlo*

*Al Dr. Casimiro Quiñonez por la buena disposición hacia mi persona y por la donación de las muestras de sardina, las cuales fueron de gran utilidad en la realización de este trabajo*

*Al Dr. Salvador Lluch por el material biológico facilitado y sus atinados comentarios y sugerencias, al Dr. Felipe Ascencio, por las observaciones emitidas en la redacción de la tesis*

*A la Dra. Thelma Castellanos y la Lic. Osvelia Ibarra por las facilidades que me otorgaron para recuperar el tiempo y trabajo perdidos*

*Al personal técnico y administrativo de las diferentes áreas del CIBNOR, que de alguna manera me ayudaron a realizar mi trabajo eficientemente, especialmente a los Técnicos Enrique Calvillo y Lucia Campos por su apoyo durante la obtención de muestras en campo y en la identificación taxonómica, a Lety, Bety, Manuel Melero, Edgar Yuen y Horacio Sandoval, por su valiosa ayuda*

*A Arturo Sierra, por todo el apoyo que me ha brindado, al Dr. Murugan por las asesorías recibidas en el laboratorio, al resto de la población del L4; especialmente a Barbarita y a Lety*

*A Flor, Valerie, Claus, Carlos, Pedro, Jesús y demás amigos con quienes he compartido gratos momentos.*

*De manera especial a Delia que fue parte fundamental de este trabajo, AMOR...GRACIAS por todo el apoyo que me has dado*

***A la vida por darme una segunda oportunidad...***

# CONTENIDO

	<b>Pagina</b>
<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>CONTENIDO</b>	v
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>INDICE DE TABLAS</b>	xi
<b>GLOSARIO</b>	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 El problema con la identificación de stocks de sardina	1
1.2 La posible existencia de subpoblaciones en México	5
1.3 El uso de técnicas moleculares para la identificación de especies	9
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>3. ANTECEDENTES</b>	14
<b>4. OBJETIVOS</b>	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15

<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
5.1 Metodología para extracción de cristalinas y electroforesis de isoelectroenfoque (IEF)	17
5.1.1 Isoelectroenfoque	18
5.2 Análisis de imágenes	19
5.3 Ensayos de preservación de tejidos de sardinas	19
5.4 Extracción de ADN genómico	20
5.5 Diseño de primers específicos para subunidades ribosomales pequeña (12S) y mayor (16S) de <i>S.s. caeruleus</i> .	21
5.6 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
<b>6. RESULTADOS</b>	24
6.1 Isoelectroenfoque (IEF)	24
6.2 Preservación de tejido muscular de sardina y aislamiento de ADN genómico	26
6.3 Amplificación mediante PCR y secuenciación de amplicones	27
<b>7. DISCUSIÓN</b>	39
<b>8. CONCLUSIONES</b>	45
<b>9. APÉNDICES</b>	48
<b>APÉNDICE 1</b> Métodos analíticos	
<b>9.1 Isoelectroenfoque (IEF)</b>	48
9.1.1 Preparación de soluciones stock para IEF	48
9.1.2 Preparación de geles de poliacrilamida para IEF	49
9.1.3 Preparación de soluciones para fijado, teñido y desteñido	51

<b>9.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</b>	51
9.2.1 Preparación de solución stock (reactivo de Bradford)	51
9.2.2 Curva estándar	51
9.2.3 Cuantificación de proteínas	51
<b>9.3 Preparación de geles de agarosa para electroforesis de ADN</b>	53
<b>9.4 Protocolo de purificación de ácidos nucleicos utilizando sílica gel</b>	53
<b>APÉNDICE 2</b> Matriz de datos usada para el análisis IEF con el programa TFPGA	55
<b>APÉNDICE 3</b> Secuencias de nucleótidos obtenidas mediante secuenciación de productos de PCR utilizando primers específicos	56
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	59

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Clasificación de peces clupeidos	1
<b>Figura 2.</b> Distribución de las poblaciones del género <i>Sardinops</i>	3
<b>Figura 3.</b> a) Morfología del adulto de <i>S. s. caeruleus</i> b) Morfología de la larva de <i>S. s. caeruleus</i>	8
<b>Figura 4.</b> Morfología del huevo de <i>S. s. caeruleus</i>	8
<b>Figura 5.</b> Mapa genético del ADN mitocondrial de peces	11
<b>Figura 6.</b> Área de estudio y año de colecta de las muestras utilizadas en el presente trabajo	16
<b>Figura 7.</b> Ejemplo de gel IEF de cristalinas de peces de las familias Clupeidae y Gerreidae	24
<b>Figura 8.</b> Árbol de distancia genética, obtenido mediante análisis del patrón electroforético de cristalinas de tres especies de clupeidos utilizando el programa TFPGA	25
<b>Figura 9.</b> Resultados obtenidos de la purificación de ADN genómico a partir de tejidos preservados mediante diferentes métodos	26
<b>Figura 10.</b> Fragmentos amplificados mediante PCR con los oligos SM12SF1/R1 y SM16SF2/R2	27

- Figura 11.** Análisis de alineamiento de la secuencia S.s.c.1a con las secuencias reportadas en el NCBI para el gen 12S ribosomal 29
- Figura 12.** Análisis de alineamiento de la secuencia S.s.c. 2G con las secuencias reportadas en el NCBI para el gen 16S ribosomal 30
- Figura 13.** Análisis de alineamiento entre el fragmento 320-595 del gen 12S ribosomal de la sardina japonesa y la secuencia obtenida en este estudio de la sardina monterrey S. s. c. 1a. 31
- Figura 14.** Árbol de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas de la subunidad ribosomal 16S de la sardina monterrey, la sardina crinuda y la secuencia correspondiente de la sardina japonesa 32
- Figura 15.** Análisis de alineamiento de las secuencias obtenidas experimentalmente para el gen 16S de la sardina monterrey, la sardina crinuda y la secuencia correspondiente de la sardina japonesa 33
- Figura 16.** Análisis de alineamiento entre la secuencia obtenida experimentalmente para el gen 12S de sardina monterrey (S.s.c. 1a) y las secuencias con mayor homología reportadas en el NCBI 35
- Figura 17.** Análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas experimentalmente para el gen 16S de sardina monterrey y las secuencias con mayor homología reportadas en el NCBI 36

**Figura 18.** Árbol de homología para el gen 12S obtenido del alineamiento de la secuencia S.s.c. 1a, con las secuencias de mayor homología encontradas mediante análisis Blast 37

**Figura 19.** Árbol de homología para el gen 16S obtenido del alineamiento de las secuencias S.s.c. 2G, S.s.c. 10M, S.s.c. 16M, y O.I. 26BP con las secuencias de mayor homología encontradas mediante análisis Blast 38

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Relación detallada de campañas de muestreo y muestras consideradas en este estudio.	17
<b>Tabla II.</b> Oligonucleótidos específicos para subunidades ribosomales pequeña (12S) y mayor (16S) de sardina monterrey <i>S.s. caeruleus</i> .	22
<b>Tabla III.</b> Programa utilizado para la amplificación de fragmentos ribosomales (12S y 16S) a partir de ADN genómico de sardina	23
<b>Tabla IV.</b> Distancias e identidades genéticas de Nei obtenidas mediante el análisis IEF de cristalinas en muestras de la Familia Clupeidae y Gerreidae	25
<b>Tabla V.</b> Especies que presentan mayor homología con la secuencia <i>S.s.c. 1a</i> (12S), obtenidas mediante alineamiento utilizando el programa Blast (NCBI)	29
<b>Tabla VI.</b> Especies que presentan mayor homología con la secuencia <i>S.s.c. 2 G</i> (16S), obtenidas mediante alineamiento con el programa Blast (NCBI)	30

## GLOSARIO

**Ácido desoxirribonucleico (ADN):** polinucleótido en el que el residuo de azúcar es desoxirribosa y que es el material genético primario en todas las células.

**Alelo:** (contracción de alelomorfo), una de dos o más formas alternativas de un gen, los cuales pueden ocupar un *locus* particular en un cromosoma.

**Aloenzima:** formas variantes de una enzima que se encuentran en diferentes individuos de la misma especie y son el resultado de la existencia de múltiples alelos dentro de una población.

**ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia, suministra los aminoácidos al ribosoma para la síntesis de proteínas.

**ATP (Adenosin 5'-Trifosfato) :** compuesto de bases nitrogenadas, una pentosa y un grupo fosfato, involucrado en las actividades bioenergéticas de las células.

**Biodiversidad:** variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas

**Endonucleasa:** enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster internos en un polinucleótido.

**Enzima de restricción:** endonucleasa que reconoce secuencias de nucleótidos específicas en el ADN y que efectúa una ruptura en el doble filamento de la molécula de ADN.

**Fenotipo:** características observables de un individuo, resultantes de la interacción entre el genotipo y el ambiente en el que ocurre.

**Genética:** rama de la biología que estudia los fenómenos de la herencia, la variación y las leyes que rigen las semejanzas y diferencias entre individuos con ascendencias comunes.

**Genotipo:** suma total de la información genética contenida en un organismo.

**IEF (IsoElectric Focusing) :** electroforesis de isoelectrenfoque, técnica que permite la separación de moléculas en base a su punto isoeléctrico.

**Locus: (plural *loci*):** punto del cromosoma en el que se localiza un gen en particular.

**PCR (polymerase chain reaction):** reacción en cadena de la polimerasa, consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN.

**Población:** grupo de organismos de la misma especie que habitan en una determinada área geográfica y se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.

**Primer:** pequeña sección de ADN de una sola hebra o de ARN que al alinearse a una hebra complementaria más larga, se extiende por la ADN polimerasa a través de la longitud de la hebra de ADN más larga.

**RAPD (random amplification of polymorphic DNA):** amplificación al azar de secuencias de ADN usando oligonucleótidos con secuencias aleatorias.

**RFLP (restriction fragment length polymorphisms):** ocurrencia de un taxón de más de una forma tipo, definida por la presencia o ausencia de un sitio particular de reconocimiento de una enzima de restricción.

**Stock:** población de organismos (idealmente), que comparte un acervo genético lo suficientemente discreto (y nominalmente identificable) para garantizar su consideración como un sistema auto-perpetuante que puede ser manejado

**Taxa/Taxón:** grupo o categoría de organismos o especies claramente distinguible de otro grupo, el grupo debe compartir un ancestro común y debe ser monofilético. Dos grupos de especies de animales que comparten un ancestro común único, son llamadas taxa hermanas.

**Templado:** el material con el cual se iniciará la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede ser un fragmento de ADN clonado o una mezcla de ADN (por ej. Una mezcla total de células humanas).

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El problema con la identificación de stocks de sardina

Los peces clupeidos (Orden: Clupeiformes) pertenecen al suborden Clupeoidei (Figura 1), integrado por 4 familias, 80 géneros y más de 300 especies. Son el suborden de vertebrados no domesticados por el hombre que proporcionan mayor cantidad de recursos alimenticios a nivel mundial, ya sea de manera directa,

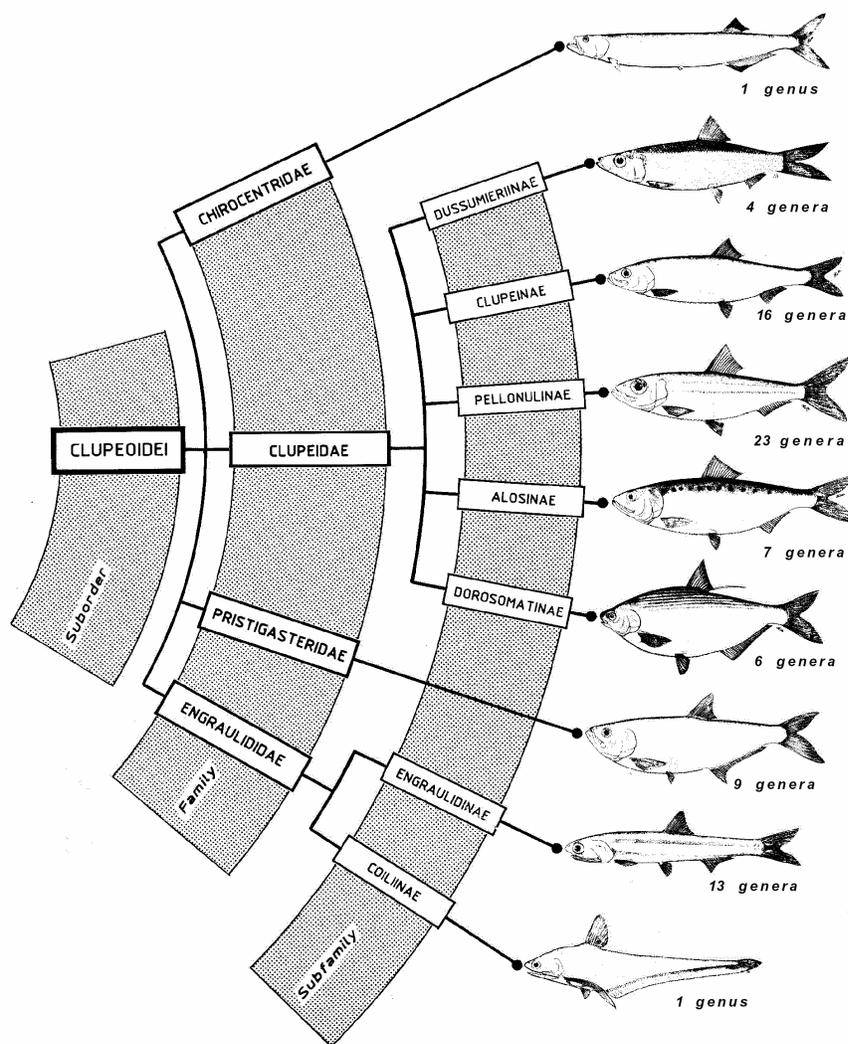
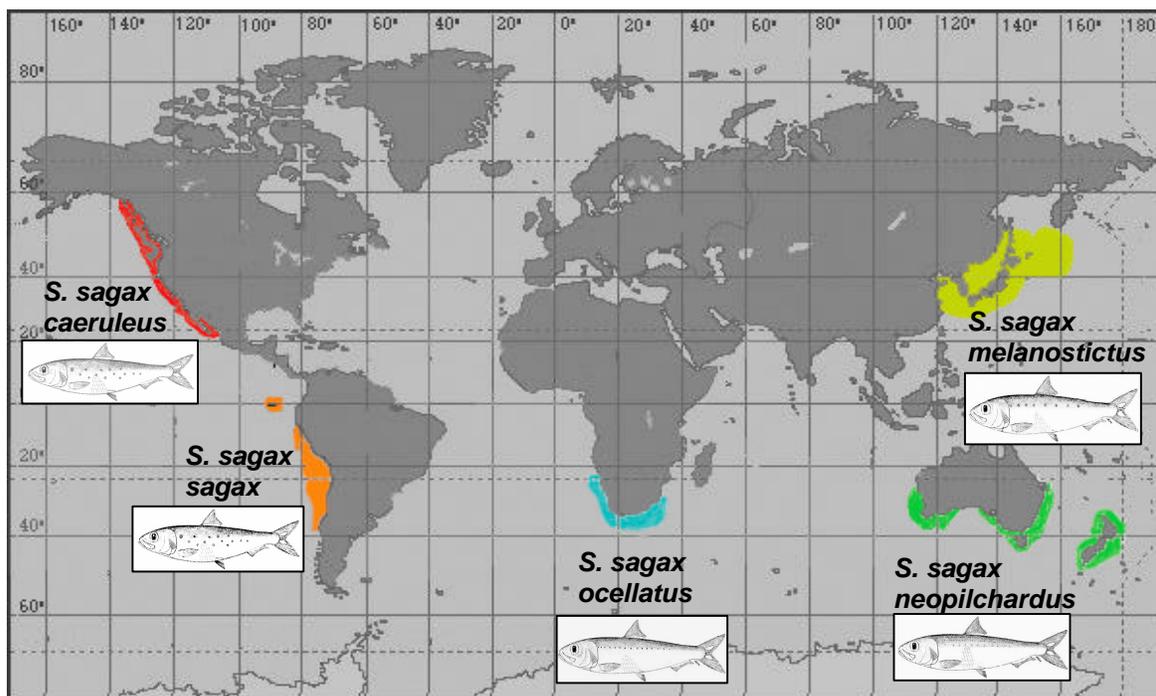


Figura 1. Clasificación de peces clupeidos (tomada de Whitehead 1985).

(mediante su consumo fresco, congelado o procesado) o indirecta (como materia prima en la producción de forraje, fertilizantes o como señuelo para capturar a otras especies de interés comercial; Whitehead 1985).

Las sardinas (Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Clupeomorpha; Clupeidae; *Sardinops*) contribuyen de manera importante en las pesquerías que soportan la explotación mundial de especies marinas (Bakun *et al.*, 1999), son un grupo de filtro-alimentadores que ocupan cinco regiones templadas de los océanos Índico y Pacífico. Las poblaciones de estos organismos están sujetas a cambios extremos en su distribución y abundancia; y no dependen únicamente de variaciones en los niveles de captura (Lluch-Cota 2000), incluso han sido clasificadas como especies altamente impredecibles, vulnerables a la explotación y difíciles de manejar (Beverton 1983, Whitehead 1985). De acuerdo a caracteres morfológicos se ha descrito la existencia de 5 poblaciones para la especie *Sardinops sagax* (Figura 2).

Debido a que la distribución de las poblaciones (stocks) de sardina no es homogénea, resulta difícil estimar su historia de vida. Sin embargo, Jacobson (2001) menciona que cuando las condiciones son favorables, la sardina puede alcanzar su talla máxima, altas tasas de crecimiento y elevada fecundidad, de tal manera que los stocks incrementan sus niveles de biomasa y llegan a cubrir una amplia extensión geográfica. Aunque comúnmente se considera a estos 5 grupos como especies separadas, Parrish *et al.* (1989) mencionan una pequeña diferenciación al nivel de aloenzimas entre poblaciones de la sardina del Pacífico, la cual podría ser producto del flujo genético entre ellas.



**Figura 2.** Distribución de las poblaciones del género *Sardinops*.  
(modificado de Okasaki *et al.* 1996).

En contraste, un estudio hecho por Okasaki *et al.* (1996) para determinar la relación genética del género *Sardinops* mediante el análisis de la variación en el ADN mitocondrial, difiere con la hipótesis de que existe flujo genético entre poblaciones geográficamente distantes, aunque hace notar una gran similitud genética entre las sardinas del Japón y Australia, posiblemente debido a cierto grado de intermezcla en estas áreas.

Bowen *et al.* (1997) han tratado de explicar la biogeografía de este taxa basándose en los modelos de dispersión y vicariante. En el primero establecen que es más factible un intercambio ó transplante entre organismos del Pacífico oriental y occidental que entre los del Pacífico norte y sur, debido principalmente a

que en aguas tropicales la temperatura superficial llega a superar los 27°C (letal para las sardinas), lo que representaría una barrera geográfica para el desplazamiento a través del ecuador, mientras que las sardinas de lados opuestos del Pacífico norte (Japón y California) y Pacífico sur (Chile y Australia) podrían tener intercambio genético. Por otra parte, utilizando el modelo vicariante consideran que el contacto entre formas regionales de sardinas puede estar mediado por movimientos a través del ecuador, posiblemente facilitados por condiciones de enfriamiento global en el pasado; bajo esta interpretación podría esperarse una estrecha afinidad filogenética entre las sardinas de California y Chile en el Pacífico oriental, y tal vez entre las de Japón y Australia en el Pacífico occidental.

El análisis de poblaciones mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) en la región control de ADN mitocondrial publicado por Stewart *et al.* (1998), reveló la aparente existencia de tres linajes monofiléticos: Sudáfrica–Australia, Chile–California, y Japón, e incluso sugieren modificar la nomenclatura del género a tres subespecies: *Sardinops sagax ocellatus* para Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Pappe, 1853), *Sardinops sagax sagax* en Chile, Perú, Ecuador, México, Estados Unidos y Canadá (Jenys, 1842), y *Sardinops sagax melanostictus* para Corea, Japón y Rusia (Temminck y Schlegel, 1846).

Durante los años 1930s y principios de los 1940s, y nuevamente en los 1980s, la sardina del Pacífico soportó grandes pesquerías. Al respecto, Kawasaki y Omori (1988) reconocen cierta sincronía en la abundancia de las sardinas de

Japón, California y Chile, concluyendo que las grandes fluctuaciones en las poblaciones de sardina son consecuencia de modificaciones en su hábitat, ocasionados por cambios en las condiciones climáticas y oceanográficas a escala decadal (Lluch-Belda *et al.* 1992, Schwartzlose *et al.* 1999, Chavez *et al.* 2003), y podría reflejarse en la arquitectura genética de las formas regionales (Bowen *et al.* 1997). Gaggiotti *et al.* (2001) mencionan que la sardina del Pacífico, a diferencia de la anchoveta del norte y otros peces relacionados, aparentemente no presenta una alta variabilidad entre individuos, aunque se conoce poco acerca de la variabilidad genética de esta familia de peces.

## **1.2 La posible existencia de subpoblaciones en México**

En México la pesquería de pelágicos menores ha llegado a aportar más del 40% de la captura total nacional (Lluch-Belda *et al.* 1994). De las ocho especies que integran esta pesquería en el Golfo de California, las mayores capturas (92% del total) corresponden a la pesquería de *S.s. caeruleus* (Cisneros-Mata *et al.* 1991). Entre los primeros estudios poblacionales realizados con la sardina del Pacífico nororiental, o sardina monterrey se pueden mencionar el realizado por Clark (1947) quien mediante el conteo de vértebras identificó dos subpoblaciones (la primera del norte de Baja California hasta Alaska y otra al sur de Baja California), en virtud de que las sardinas que habitan California y Baja California presentan intermezclas, mientras que las de Baja California Sur y Golfo de California al parecer constituyen un grupo aparte que no se mezclaría con las del norte, y en caso de hacerlo sería en menor proporción. Vrooman (1964) estudiando diferentes

tipos sanguíneos también hace mención de las dos subpoblaciones anteriores, e incluso reportó una tercer subpoblación en el Golfo de California. Veinticinco años después Hedgecock *et al.* (1989), al hacer un estudio genético y morfométrico con sardinas procedentes de California, Baja California Sur y Golfo de California, y comparar sus resultados con datos de la variabilidad observada en las poblaciones de anchoveta *Engraulis mordax*, determinaron que a nivel de aloenzimas existía muy poca variabilidad entre las poblaciones de sardina estudiadas, es decir, que al menos respecto a los genes analizados eran genéticamente idénticas, coincidiendo con lo reportado por Parrish, *et al.* (1989). Hasta la fecha se considera que esta población de sardina está integrada por tres stocks: uno al norte de California hasta Alaska, otro en Baja California y un tercero en el Golfo de California (Mc Crae 1994).

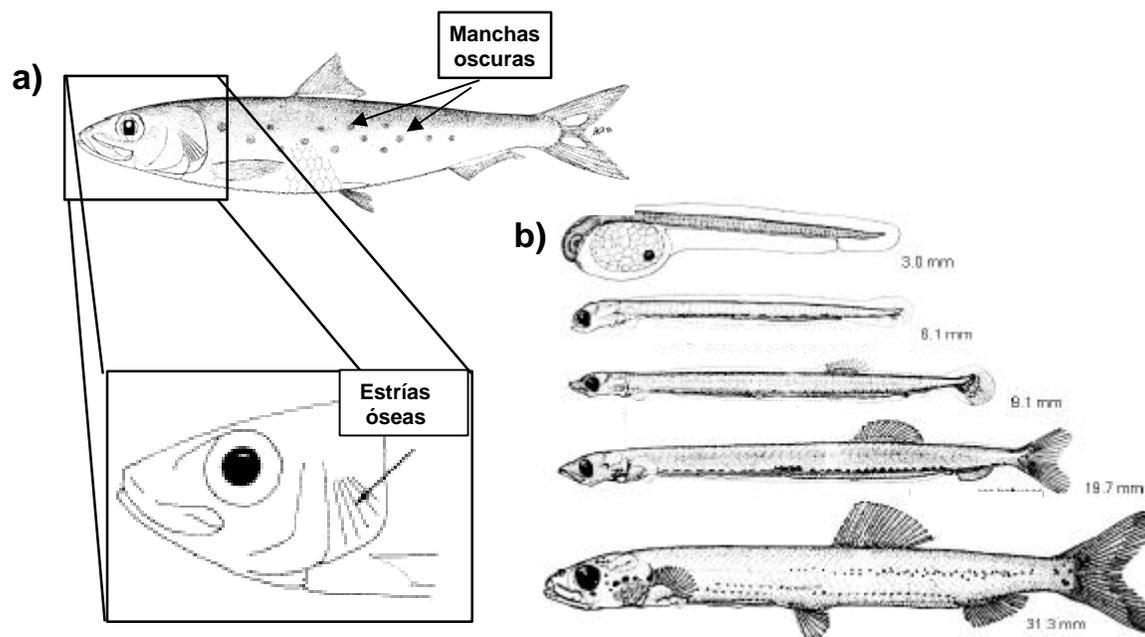
La identificación de stocks y el conocimiento de su estructura, así como de otros factores biológicos y ecológicos son esenciales para desarrollar planes de manejo de los recursos pesqueros (Elliot 1996), la genética, técnicas de marcado y recaptura, análisis químico de tejidos y partes duras, estudios biométricos y los sistemas de análisis de imágenes son algunas de las disciplinas mas comúnmente utilizadas para discriminar entre stocks de peces (Cadrin y Friedland 1999).

La sistemática de peces clupeidos se ha basado en gran medida en caracteres morfológicos. Algunas especies tropicales y subtropicales son difíciles de identificar, e incluso puede requerirse el empleo de microscopio y gente experimentada (Whitehead 1985). Para *S.s. caeruleus* Whitehead y Rodríguez-Sanchez (1994) mencionan como caracteres distintivos de la especie: *zona baja*

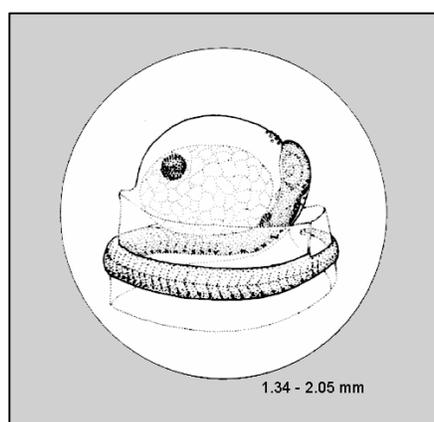
*del opérculo con evidentes estrías óseas radiantes hacia abajo y una serie de manchas oscuras a lo largo de la línea lateral del cuerpo* (Figura 3a), aunque algunos ejemplares carecen totalmente de manchas. Sin embargo, este criterio difícilmente puede aplicarse para identificar larvas y huevos de sardina. La identificación de larvas (Figura 3b) al nivel de familia se realiza utilizando los siguientes caracteres de diferenciación: presencia de pigmento en la boca, de glóbulos de aceite, pigmentos migratorios, ubicación del ano con respecto a la longitud del cuerpo, ubicación de las aletas dorsal y anal, entre otros (Moreno–Garibay 1978).

Por otra parte, para identificar huevos (Figura 4) se toma en cuenta principalmente la morfología externa, que en este caso es esférica, así como la segmentación del vitelo (Matarese *et al.* 1983), aunque cabe señalar que ambos caracteres no son exclusivos de la familia Clupeidae.

No obstante, los estudios de cuantificación de productos de desove (huevos y larvas) constituyen una herramienta de gran utilidad, para incrementar el conocimiento acerca de la dinámica de una población de peces sujeta a explotación.



**Figura 3.** a) Morfología del adulto de *S. s. caeruleus* (Modificado de Whitehead 1985), b) Morfología de la larva de *S. s. caeruleus* (Tomado de Luna 1999).



**Figura 4.** Morfología del huevo de *S. s. caeruleus* (Tomado de Matarese *et al.* 1989)

Al cuantificar los productos de desove se pueden realizar estimaciones acerca de la abundancia de las poblaciones y de la biomasa desovante, calculando la abundancia de los huevos y larvas jóvenes. Sin embargo, a pesar de la valiosa información que se puede obtener de estos estudios, la separación y conteo del producto de desove es un proceso largo, dado el limitado número de muestras que puede ser analizado diariamente. Aún cuando la mayoría de las larvas (aproximadamente 95% de las especies conocidas) pueden ser identificadas al nivel de familia (Smith *et al.* 1979), esta situación se complica cuando se quiere identificar con mayor exactitud huevos y larvas de especies pertenecientes a un mismo género.

### **1.3 El uso de técnicas moleculares para la identificación de especies**

El empleo de herramientas moleculares puede contribuir en el análisis e identificación de muestras de productos de desove, en menor tiempo y con un alto grado de precisión.

La diversidad genética es un componente fundamental de la biodiversidad de las especies. Cuando las especies están compuestas de poblaciones independientes, existe diversidad genética dentro y entre estas poblaciones. La diversidad genética de rasgos morfológicos o morfométricos es difícil de medir en poblaciones naturales, especialmente cuando estos rasgos son influenciados por factores ambientales y la interacción de diversos genes contribuye en su expresión (fenotipo). El uso de marcadores moleculares ha permitido superar este problema

gracias a que los rasgos moleculares son virtualmente independientes del ambiente (genotipo) y sólo uno o unos cuantos genes están implicados en su expresión (EPA 2001).

En los vertebrados, el ADN mitocondrial es una molécula pequeña de doble cadena y circular contenida en las mitocondrias, su tamaño más frecuente en vertebrados es de 500 a 16,500 pares de bases (pb), y comparado con el ADN nuclear es más eficiente. Por ejemplo, raramente contiene secuencias no codificantes o duplicadas. El ADN mitocondrial contiene 13 genes codificantes para proteínas, 2 genes que codifican para ARN ribosomal (la subunidad pequeña 12S y la subunidad mayor 16S rARN). El gen que codifica la subunidad 12S está constituido de 819 a 975 pb, mientras que el de la subunidad 16S cuenta con alrededor de 1,571–1,640 pb. El ADN mitocondrial presenta además 22 genes que codifican los ARN's de transferencia (ARNt) y una región mayor no codificante o región de control. Las proteínas que son codificadas por los genes del ADN mitocondrial son: siete subunidades de NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), citocromo b (Cytb), tres subunidades de citocromo c oxidasa (CO I, II, III) y dos subunidades de ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8; Figura 5).

Para determinar la diversidad genética en organismos marinos se han utilizado diversas técnicas de biología molecular (Davies *et al.* 2001) aplicándolas en varias áreas de las pesquerías, particularmente en el análisis de la estructura de la población, la taxonomía y la acuicultura (Ferguson *et al.* 1998).



primers al ADN. Con marcadores a nivel de ADN se puede comparar la variación entre regiones codificantes y no codificantes (Davies *et al.* 2001). Con enzimas de restricción (endonucleasas) se puede cortar el ADN, obteniéndose fragmentos de restricción polimórficos (RFLP's) que se utilizan como caracteres binarios en los análisis filogenéticos. Usualmente se usan enzimas que reconocen sitios con 6 pares de bases (pb), para hacer estudios evolutivos entre especies distantes; cuando se desea obtener información más detallada se emplean enzimas con sitios de reconocimiento de 4 pb, por ejemplo, para estudios con especies estrechamente relacionadas o cuestiones a nivel de población (Meyer 1994).

Las secuencias de ARN ribosomal han sido empleadas en estudios filogenéticos de diversos taxa como por ejemplo: peces (Orti *et al.* 1996), insectos (Yogesh y Milind 2000) y microalgas (Hsuan *et al.* 2001)

En algunos estudios taxonómicos y de estructura poblacional se ha empleado el estudio de las cristalinas, para identificar diferencias intraespecíficas en los patrones electroforéticos de estas proteínas en numerosos peces marinos y de agua dulce (Whitmore 1990).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La confusión sobre la existencia de subpoblaciones ó stocks de la sardina del Pacífico al igual que la biogeografía del género *Sardinops* continúa, coincidentemente, algunos de los estudios fueron hechos en años en los que las capturas mundiales de sardina disminuyeron, desconociéndose si esto pudo haber influenciado los resultados de estos trabajos. A la fecha, los estudios genéticos realizados con *Sardinops* siguen siendo escasos en comparación con los esfuerzos que se hacen para otras especies de interés comercial, como por ejemplo el salmón *Oncorhynchus keta* (Kim *et al.* 1998).

Las subpoblaciones son unidades biológicas naturales y su identificación es necesaria para el manejo de las pesquerías (Hedgecock 1984). El uso de secuencias ribosomales ha permitido discriminar entre especies de bacterias, protozoos parásitos, artrópodos, moluscos y vertebrados, e incluso la identificación de stocks o subpoblaciones de peces marinos. La implementación de estas herramientas podría facilitar el análisis de muestras de tejido y productos de desove de la sardina monterrey, así como en la generación de una base de datos genéticos, que en el futuro sea útil en la discriminación de stocks o subpoblaciones de *S. s. caeruleus*.

### 3. ANTECEDENTES

Además de los trabajos citados anteriormente, enfocados al estudio del género *Sardinops*, y específicamente a la sardina del Pacífico o monterrey, se han realizado otros estudios genéticos en pesquerías. Algunos ejemplos son el análisis de la variación de aloenzimas y ADN mitocondrial entre poblaciones de *Hoplostethus atlanticus* de Australia y el Atlántico Norte (Elliot *et al.* 1994), en *Lutjanus malabaricus* (Elliot 1996) y en tres especies de la familia Oreostomatidae (Ward *et al.* 1998). Grewe *et al.* (1997) estudiaron la estructura genética de una población de *Thunnus maccoyii*; Kim *et al.* (1998) discriminaron entre poblaciones de *Oncorhynchus keta* de diferentes localidades mediante el análisis de fragmentos de restricción (RFLP); Kazuo *et al.* (2000) determinaron la magnitud de diferenciación intra- e inter-específica del pargo (*Pagrus major*), colectados en las áreas de Japón; Gharrett *et al.* (2000) han identificado especies del género *Sebastes* mediante análisis de sitios de restricción de las regiones ND-3/ND-4 y 12S/16S del ARN ribosomal; Inoue *et al.* (2000) reportaron la secuencia completa del ADN mitocondrial de la sardina japonesa *S. s. melanostictus*, y Ward y Elliot (2001) estudiaron la estructura genética de diferentes especies de peces del sureste de Australia.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Analizar técnicas electroforéticas y moleculares como herramientas para la identificación y delimitación de stocks de peces clupeidos.

### 4.2 Objetivo específico

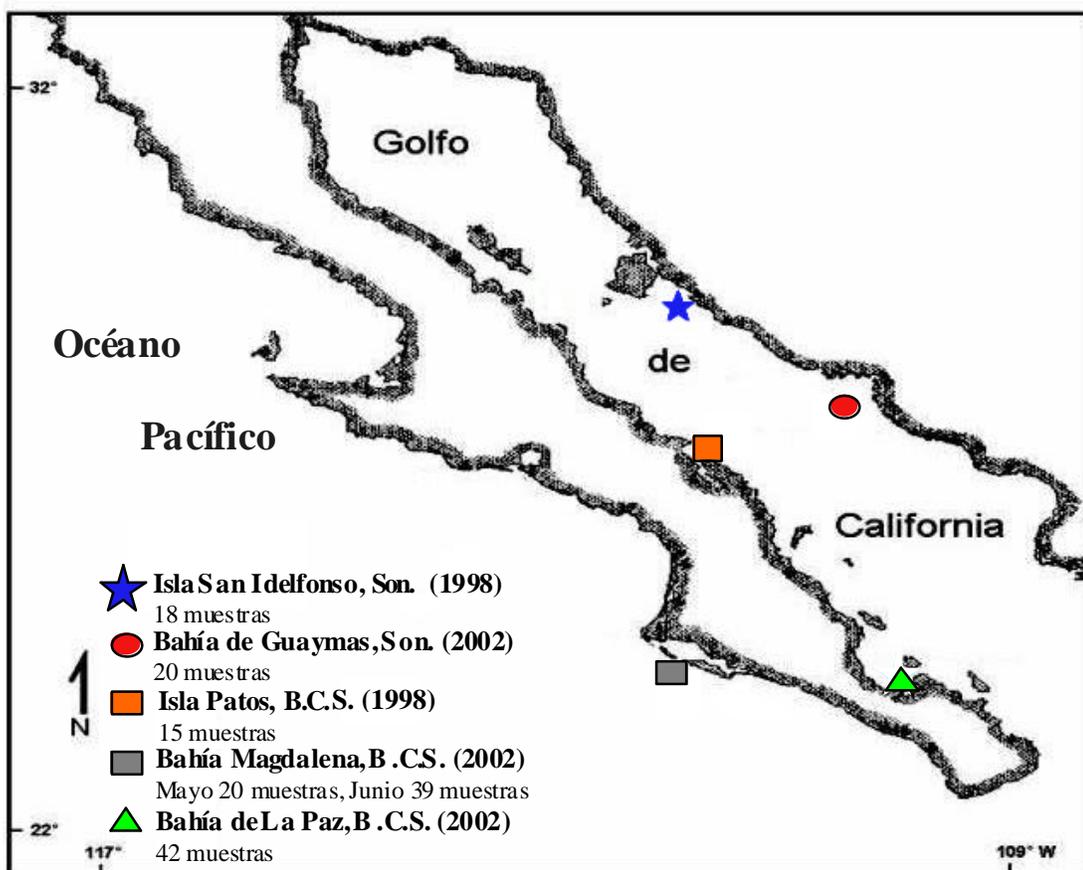
Evaluar la aplicación de electroforesis de isoelectroenfoque de cristalinas como herramienta para la determinación de poblaciones e identificación de organismos pertenecientes al género *Sardinops*.

Evaluar el empleo de secuencias ribosomales de las subunidades 12S y 16S como una alternativa para la delimitación de poblaciones e identificación de la sardina del Pacífico *S. s. caeruleus*.

Analizar las secuencias ribosomales obtenidas y confrontarlas con las bases de datos existentes, para definir regiones especie-específicas de uso potencial en el diseño de sondas genéticas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se estudiaron muestras de *S. s. caeruleus* donadas por el Dr. Casimiro Quiñones de CICIMAR-IPN, colectadas en el Golfo de California (Isla Patos e Isla San Idelfonso) en 1998 y en la Bahía de Guaymas (Sonora) en el 2002. Adicionalmente se analizaron muestras obtenidas en Bahía Magdalena (costa Pacífico) durante mayo y junio del 2002, así como muestras de tejido de peces de los géneros *Harengula*, *Lile*, *Opistonema* y *Gerreidae* capturadas en la Bahía de La Paz, B.C.S en el mismo año (Figura 6).



**Figura 6.** Área de estudio y año de colecta de las muestras utilizadas en el presente trabajo.

La relación detallada de las muestras así como su estado de preservación, se muestran en la tabla 1. Las muestras frescas de Bahía de La Paz, fueron colectadas directamente en campo usando una red tipo atarraya, mientras que las muestras de Bahía Magdalena se colectaron a bordo de un barco sardinero, recogiénolas directamente de la plataforma cuando la red fue vaciada en cubierta. Los organismos se mantuvieron en hielo e inmediatamente fueron transportadas al laboratorio donde se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

**Tabla I.** Relación detallada de campañas de muestreo y muestras consideradas en este estudio.

Lugar de Colecta	Fecha	No. de muestras	Genero	Tipo de preservación
Bahía Magdalena, B.C.S.	Mayo, 2002	20	<i>Sardinops</i>	Congeladas
Bahía Magdalena, B.C.S.	Junio, 2002	39	<i>Sardinops</i>	Congeladas
Bahía de La Paz, B.C.S.		42	<i>Sardinops</i>	Congeladas
			<i>Opisthinema</i>	Congeladas
			<i>Gerreidae</i>	Congeladas
			<i>Lile</i>	Congeladas
			<i>Harengula</i>	Congeladas
Guaymas, Son.	Octubre, 2002	20	<i>Sardinops</i>	Congeladas
Isla San Idelfonso, Son.	1998	18	<i>Sadinops</i>	Fijadas en alcohol
Isla Patos, B.C.S.	1988	15	<i>Sardinops</i>	Fijadas en alcohol

### 5.1 Metodología para extracción de cristalinas y electroforésis de isoelectroenfoco (IEF)

Se realizó la disección de las ojos de cada uno de los organismos experimentales previamente congelados, y se extrajo el lente (cristalinas). El extracto crudo de proteínas se obtuvo homogenizando los lentes en tubos eppendorf de 1.5 mL con

un microhomogenizador (Pellet Pestle, KONTES) y 400  $\mu$ L de buffer de fosfatos (pH 7.8) previamente enfriado (4°C). Las muestras fueron centrifugadas a 17,000xg en una microcentrífuga refrigerada (Beckman GS-R15R) a 4°C durante 10 minutos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se realizó una dilución 1:750 para determinar la concentración de proteínas en el extracto por el método de Bradford (1976) (Apéndice 1). La concentración de proteínas en los extractos fué ajustada a 40 mg/mL y las muestras así preparadas se congelaron a -20°C para su posterior análisis mediante IEF.

#### **5.1.1. Isoelectroenfoque (IEF)**

Para el análisis IEF, los extractos protéicos fueron descongelados en un baño de hielo, a cada uno se le adicionó buffer desnaturizante de urea (urea 9.5M, tritón 100X 2%, anfolinas 3-10 2% y ditioneol 50mM) en proporción 1:1. De estas preparaciones se tomaron 2  $\mu$ L para cargar en geles de poliacrilamida horizontales (Apéndice 1). Se utilizó como estándar de punto isoeléctrico (pI) un marcador comercial (IEF Standar Bio-Rad) con un intervalo de pI de 4.5 a 9.6. Para la separación se utilizó un sistema para IEF modelo 111 Mini de Bio-Rad, las condiciones del corrimiento de la electroforésis fueron 10 minutos a 100V y 70 minutos a 200V en un gradiente de pH de 3 a 10 (Byo-Lyte 3/10 Ampholyte, Bio-Rad). Al finalizar la separación los geles fueron fijados con solución de fijación (ácido sulfosalicílico 4%, ácido tricloroacético 12.5% y metanol 30%), teñidos (etanol 27%, ácido acético 7%, azul brillante de Comassie R-250 0.04%,  $\text{CuSO}_4$

0.5%) y desteñidos serialmente con 2 soluciones de desteñido (solución I: isopropanol 12%, ácido acético 7%,  $\text{CuSO}_4$  0.5%; solución II: isopropanol 12%, ácido acético 7%) durante 1 a 2 horas.

## **5.2 Análisis de imágenes**

Los geles IEF obtenidos fueron digitalizados utilizando el programa UVIDOC, creándose una matriz de datos en la que cada banda fue considerada como un *locus*, basándose en la presencia (1) o ausencia (2) de bandas de determinado punto isoeléctrico, teniendo como referencia el estándar de pI conocido. Posteriormente, la matriz de datos fue analizada utilizando el programa TFPGA, herramientas para el análisis de datos de genética de poblaciones desarrollado por Miller (1997). Para la obtención de árboles de distancia genética (Nei 1978), asumiendo que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

## **5.3 Ensayos de preservación de tejidos de sardinas**

En virtud de que el proceso de descomposición de la sardina es relativamente más rápido que en otros peces (com. pers. S.E. Lluch-Cota. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.), lo cual puede influir considerablemente en la cantidad y calidad de ADN que puede ser extraído, se probaron diferentes métodos de preservación de tejido (músculo e hígado) con etanol 70%, formol 8%, refrigeración a 4°C y congelamiento a -20°C durante 4 días.

#### **5.4 Extracción de ADN genómico**

Para el aislamiento de ADN a partir de tejido muscular preservado en etanol 70% se probaron dos técnicas, en la primera el tejido fue digerido con buffer de lisis (Tris 0.1M pH 8.0, EDTA 0.1M, NaCl 0.15M 2%  $\beta$  mercaptoetanol, 4% sarcosil) y 6.6  $\mu$ L de pronasa (Sigma), se incubó durante 2 horas, agitando los tubos cada 30 minutos y adicionando otros 6.6  $\mu$ L de pronasa después de la primer hora de incubación. Se agregó un volumen de cloroformo/ alcohol isoamílico 24:1, y se centrifugó a 17,000xg durante 10 minutos a 25°C. La fase acuosa fue recuperada en tubos nuevos y se le agregó etanol absoluto para la precipitación de los ácidos nucleicos, dejándolos toda la noche a -20°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 17,000xg durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue desechado; al botón (o pellet) obtenido (ADN) se le realizaron tres lavados con etanol 70%, centrifugando finalmente a 17,000xg. Para eliminar residuos de etanol los tubos fueron secados al aire a temperatura ambiente, y al botón resultante se le agregaron 99  $\mu$ L de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.5) y 1 $\mu$ L de ARNasa, incubándolos durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se realizó una segunda extracción con un volumen de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, se cuantificó y se determinó la pureza del ADN mediante espectrofotometría con luz UV por el método de Warburg-Christian (1941). La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa/TBE (Tris 80mM; ác. Bórico 80mM, EDTA 1mM, pH 8.0) al 0.8% preteñidos con bromuro de etidio (Apéndice 1), llevándose a cabo la electroforesis en una cámara horizontal (Wide

Mini-Sub Cell, Bio-Rad) a 70V durante 1 hr a temperatura ambiente. Los geles se observaron bajo luz UV y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc.

Las muestras preservadas en etanol 70% (Isla San Patos e Isla Idelfonso), fueron procesadas siguiendo el método de Chelex (Walsh *et al.* 1991), colocando el tejido en tubos de 1.5 µL y adicionando 100 µL de agua destilada estéril más 100 µL de Chelex 5% frío, incubándolos a 56°C (en un baño maría) durante 20 minutos. Después, los tubos fueron agitados en un vortex durante 10 segundos e incubados a 100°C por 8 minutos, al terminar la incubación los tubos fueron agitados durante 10 segundos más en un vortex; finalmente la fase acuosa que contenía el ADN fue separada del resto del material centrifugando a 17,000xg por 3 minutos. En este caso el ADN no se cuantificó ni se verificó mediante electroforesis; para las reacciones de PCR se tomaron 10-15 µL de sobrenadante como templado.

### **5.5 Diseño de primers específicos para subunidades ribosomales pequeña (12S) y mayor (16S) de *S. s. caeruleus***

Los oligonucleótidos específicos empleados en este trabajo (SM12F1/ SM12R1 y SM16F2/ SM16R2) fueron diseñados a partir de secuencias reportadas por Inoue *et al.* (2000) para ambas subunidades ribosomales en *S. s. melanostictus*, que flanquean zonas hipervariables reveladas mediante análisis de alineamiento Blast con otras secuencias de vertebrados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

**Tabla II.** Oligonucleótidos específicos para subunidades ribosomales, pequeña (12S) y mayor (16S) de sardina monterrey *S.s. caeruleus*.

Nombre del oligo	Secuencia	Tamaño esperado del producto (pb)
<b>SM12F1</b>	5'- ACCGCGGTTATACGA -3'	297
<b>SM12R1</b>	5'- TAGAACAGGCTCCTCT -3'	
<b>SM16F2</b>	5'- ACCTGTATGAATGGCA -3'	476
<b>SM16R2</b>	5'- CTCAGATCACGTAGGA -3'	

### 5.6 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN obtenido con ambos métodos de extracción fue usado como templado para la amplificación de los fragmentos específicos correspondientes a ambas regiones ribosomales. La mezcla de reacción contenía 1µL de ADN (100 ng/µL) o 10 a 15 µl de las extracciones con Chelex, 1 µl de cada oligo SM12F1-SM12R1 o SM16F2-SM16R2 (10 pM), 5 µL de buffer PCR 10X, 1 µL de dNTP's (10mM), 18.3 µL de agua mili-Q esteril y 1U de Taq pol (0.2 µL). Finalmente se adicionaron 30 µL de aceite mineral. Las mezclas de reacción fueron amplificadas en un termociclador Techne (GENIUS, Mod. FGEN05TP) utilizando el programa mostrado en la tabla 3. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa/TBE al 1% preteñidos con bromuro de etidio (Apéndice 1), llevándose a cabo la electroforésis en una cámara horizontal (Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad) a 70V durante 1 hr a temperatura ambiente. Los geles se observaron bajo luz UV en un transiluminador, y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc. Los productos de PCR fueron purificados con el método de silica gel

(Davies *et al.* 1986) y enviados a Seúl (Corea) para su secuenciación por la empresa MACROGEN (<http://www.macrogen.com>). Se realizaron análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas para cada subunidad ribosomal, usando el programa DNAMAN, adicionalmente se realizaron análisis de alineamiento Blast entre las secuencias obtenidas en el presente estudio y aquellas reportadas en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para ambas subunidades ribosomales.

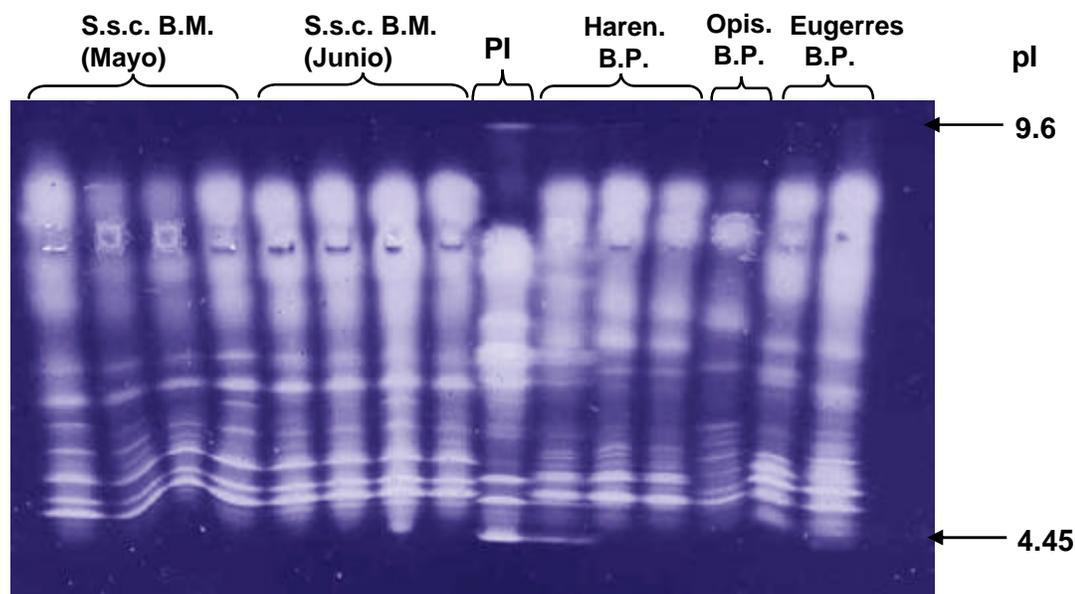
**Tabla III.** Programa utilizado para la amplificación de fragmentos ribosomales (12S y 16S) a partir de ADN genómico de sardina.

Etapa	Temperatura/Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C/5'	1
Alineamiento	94°C 30"/40°C 30"/72°C 1'	40
Extensión	72°C 10'	1

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Isoelectroenfóque (IEF)

En la figura 7 se muestra una imagen representativa de los patrones electroforéticos obtenidos mediante la técnica de IEF de cristalinas extraídas de organismos pertenecientes a la familia Clupeidae (géneros: *Sardinops*, *Harengula*, *Opistonema*) y Gerreidae (género: *Eugerres*). El análisis con el programa TFPGA permitió calcular la distancia genética entre las muestras (Tabla 4), además de crear un árbol que representa gráficamente interrelaciones entre las distancias genéticas de los individuos considerados en este estudio (Figura 8).

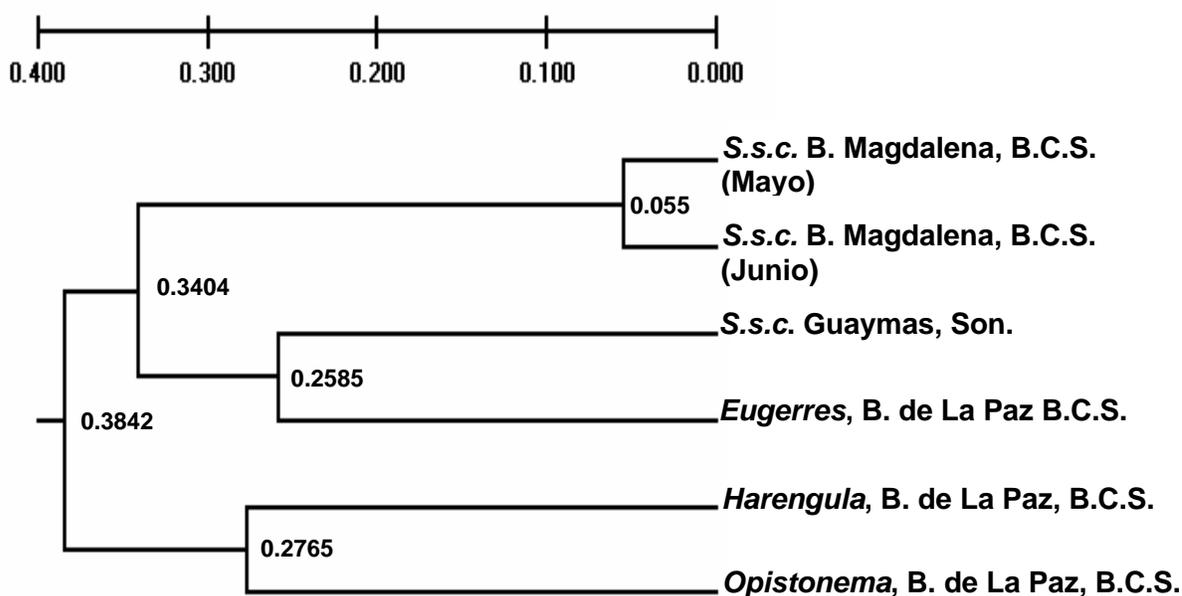


**Figura 7.** Ejemplo de gel IEF de cristalinas de peces de las familias Clupeidae y Gerreidae (pI = Marcador de punto isoeléctrico).

**Tabla IV.** Distancias e identidades genéticas de Nei obtenidas mediante el análisis IEF de cristalinas en muestras de la Familia Clupeidae y Gerreidae.

Subpoblaciones comparadas	Distancia	Identidad	Distancia imparcial	Identidad imparcial
Ssc BMM vs Ssc BMJ	0.0550	0.9464	0.0463	0.9548
Ssc BMM vs Ssc B Gu	0.3423	0.7102	0.3305	0.7186
Ssc BMM vs <i>Harengula</i> BP	0.4329	0.6486	0.4231	0.6550
Ssc BMM vs <i>Opistonema</i> BP	0.4175	0.6587	0.4134	0.6614
Ssc BMM vs <i>Eugerres</i> B.P	0.3474	0.7065	0.3392	0.7124
Ssc BMJ vs Ssc BGu	0.3350	0.7153	0.3228	0.7241
Ssc BMJ vs <i>Harengula</i> BP	0.4839	0.6164	0.4736	0.6227
Ssc BMJ vs <i>Opistonema</i> BP	0.3644	0.6946	0.3597	0.6979
Ssc BMJ vs <i>Eugerres</i> BP	0.3369	0.7140	0.3282	0.7202
Ssc BGu vs <i>Harengula</i> BP	0.3212	0.7252	0.3080	0.7349
Ssc BGu vs <i>Opistonema</i> BP	0.3049	0.7372	0.2972	0.7429
Ssc BGu vs <i>Eugerres</i> BP	0.2585	0.7722	0.2468	0.7813
<i>Harengula</i> BP vs <i>Opistonema</i> BP	0.2765	0.7584	0.2709	0.7627
<i>Harengula</i> BP vs <i>Eugerres</i> BP	0.3903	0.6768	0.3806	0.6834
<i>Opistonema</i> BP vs <i>Eugerres</i> BP	0.3583	0.6988	0.3542	0.7010

Notación: B.M.M.=Mayo; B.M.J.=Junio; B.Gu.=Guaymas; B.P.= Bahía de La Paz.

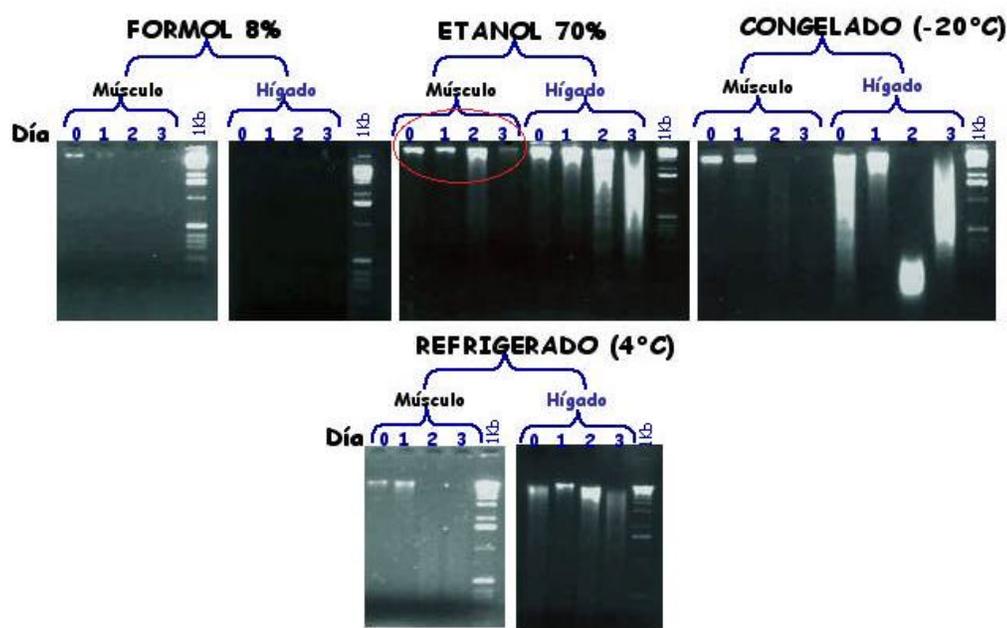


**Figura 8.** Árbol de distancia genética, obtenido del análisis de los patrones electroforéticos de cristalinas de tres especies de clupeidos utilizando el programa TFPGA.

## 6.2 Preservación de tejido muscular de sardina y aislamiento de ADN genómico.

De los 4 métodos de preservación probados (etanol 70%, formol 8%, refrigeración a 4°C y congelamiento a -20°C), se eligió utilizar el etanol al 70% para la extracción de ADN genómico obteniendo preparaciones de mejor calidad a partir de muestras de músculo (Figura 9).

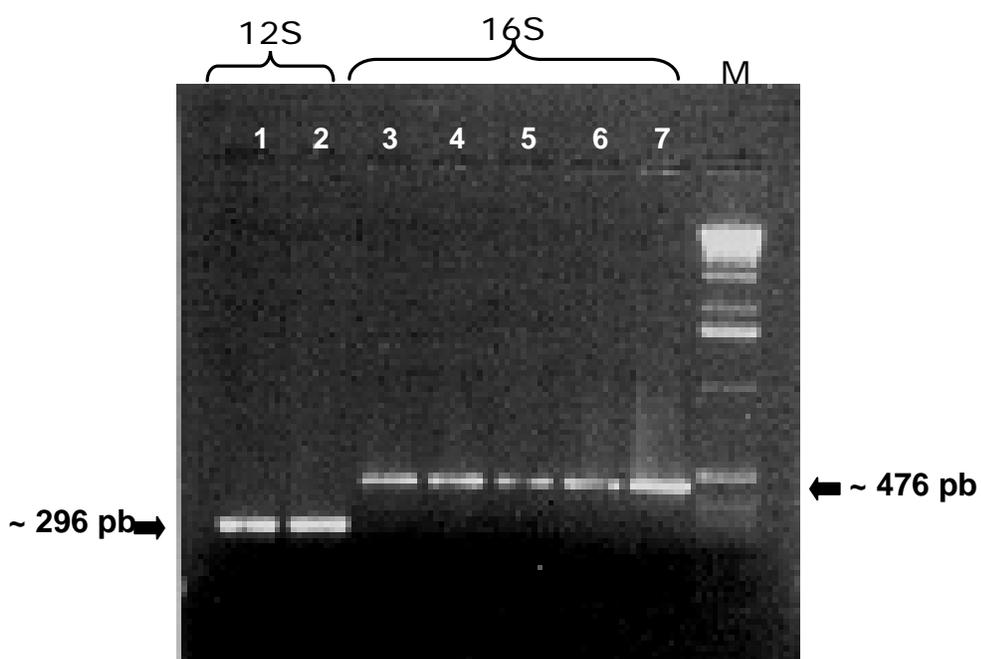
Se logró aislar ADN genómico usando el método de extracción con fenol/cloroformo, de las muestras de *S. s. caeruleus* colectadas en Bahía Magdalena (Mayo y Junio) y Guaymas, y de los géneros *Lile*, *Harengula*, *Opistonema* y *Gerreidae*. El ADN de muestras preservadas en etanol 70% en 1998 (Isla San Idelfonso e Isla Patos), fue aislado satisfactoriamente utilizando el protocolo de Chelex.



**Figura 9.** Resultados obtenidos de la purificación de ADN a partir de tejidos preservados mediante diferentes métodos (fijados en formol, etanol, refrigerados a 4°C y congelados a -20°C durante 4 días).

### 6.3 Amplificación mediante PCR y secuenciación de amplicones obtenidos

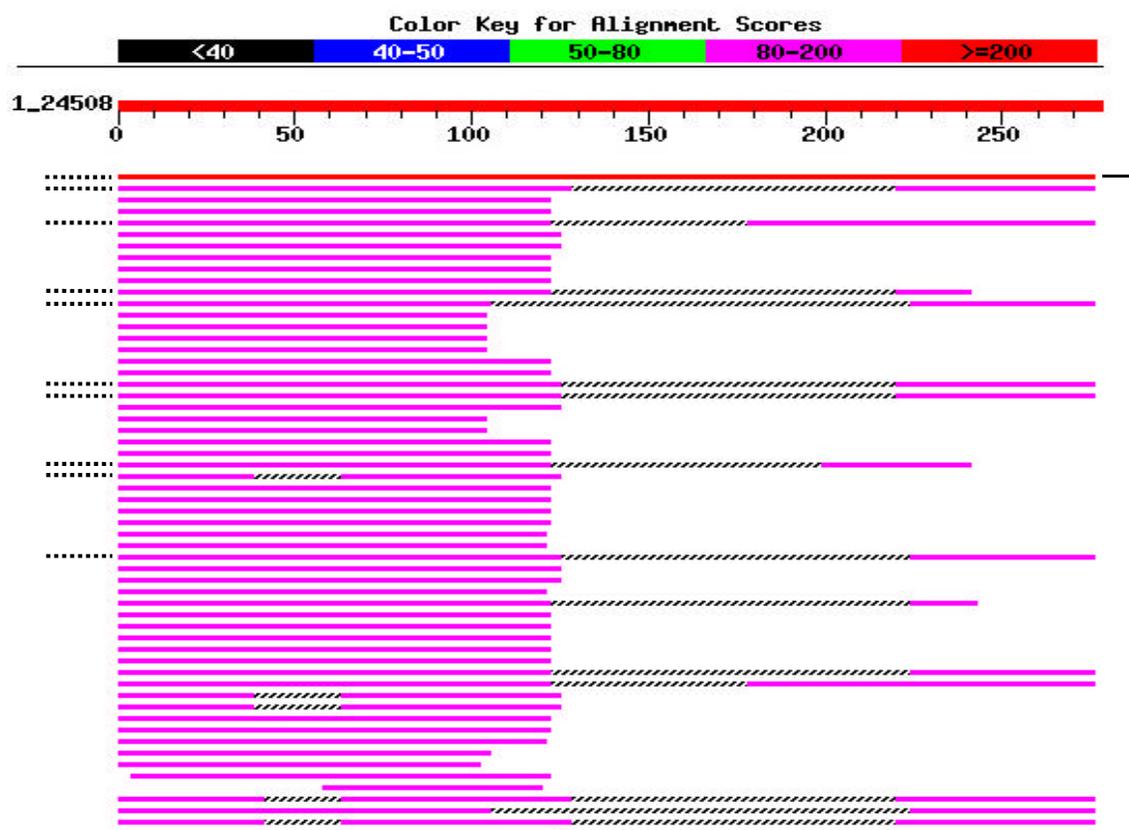
Mediante la reacción en cadena de la polimerasa y usando los primers específicos SM12F1/R1 y SM16SF2/R2, fue posible amplificar fragmentos del tamaño esperado (Figura 10) usando como templado ADN purificado de muestras frescas mediante la técnica de cloroformo/alcohol isoamílico, y ADN aislado de muestras preservadas en etanol al 70% procesadas con Chelex.



**Figura 10.** Fragmentos amplificados mediante PCR con los oligos SM12SF1-SM12SR1 (carriles 1 y 2) y SM16SF2-SM16SR2 (carriles 3 a 7). Carriles 1, 3, 4, 5 y 6 templado de ADN obtenido mediante el método de cloroformo/alcohol isoamílico; carriles 2 y 7 templado de ADN obtenido mediante la técnica de Chelex (M=marcador de 1Kb).

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en Seúl, Corea por la empresa MACROGEN, obteniendo las secuencias S.s.c. 1a y S.s.c. 3a para la subunidad 12S, y S.s.c. 2G, S.s.c. 10M, S.s.c. 16M, y O.I. 26B.P (Apéndice 3) para la subunidad 16S. El análisis de alineamiento entre las secuencias de la subunidad 12S obtenidas en el presente trabajo con aquellas registradas en las bases de datos mundiales (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para otras especies de peces y vertebrados se presenta en la figura 11, y el análisis de las secuencias de la subunidad 16S con el mismo formato se muestra en la figura 12. En ambas figuras, y como se muestra en las tablas 5 y 6, se obtuvo un 98 y 99% de identidad (genes 12S y 16S respectivamente) entre las secuencias de *S. s. caeruleus* obtenidas en este estudio y aquella de *S. s. melanostictus* que corresponde a la primera línea (flecha). Cabe señalar que para elaborar las tablas, en cada caso se consideraron las 10 secuencias con las que se obtuvo un mayor porcentaje de identidad (.....), incluyendo aquellas con regiones variables dentro de las secuencias.

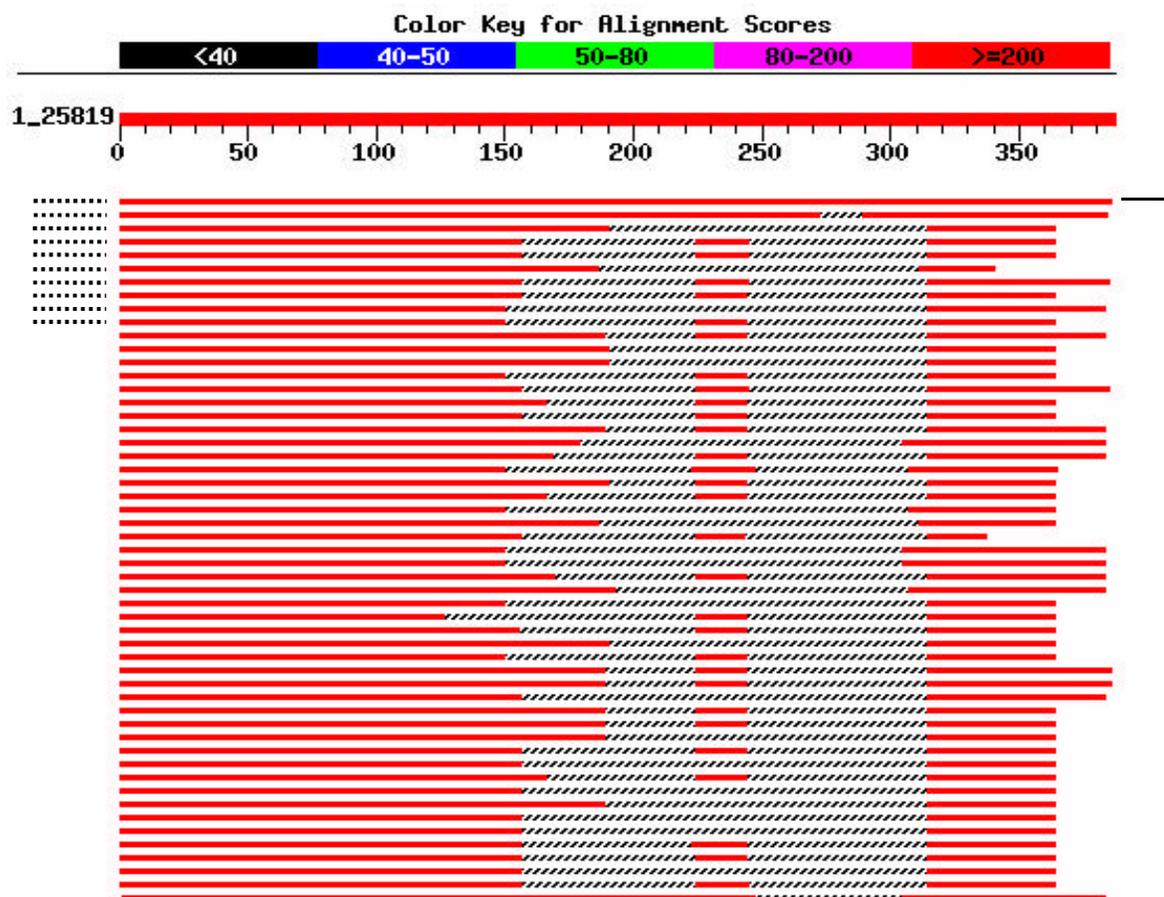
En la figura 11 se observa en gris oscuro (flecha) el alineamiento de la secuencia obtenida para el gen 12S de *S. s. caeruleus* con *S. s. melanostictus*, y la siguiente línea corresponde *Sardinella hualiensis*, como se muestra en la tabla 5. Cabe señalar que las regiones con alta homología están representadas con barras completas, mientras que las regiones variables están denotadas como barras punteadas. El mismo tipo de resultados se obtiene para el gen 16S (Figura 12, Tabla 6), sin embargo, en este caso la especie con la que se tuvo mayor homología después de *S. s. melanostictus* fue *Clupea harengus*.



**Figura 11.** Análisis de alineamiento de la secuencia S.s.c.1a con las secuencias reportadas en el NCBI para el gen 12S ribosomal.

**Tabla V.** Especies que presentan mayor homología con la secuencia S.s.c. 1a, (12S), obtenidas mediante alineamiento utilizando el programa Blast (NCBI).

Familia	Especie	No. de acceso (NCBI)	Bases	Homología
Clupeidae	<i>S.s. melanostictus</i>	AB032554.1	320 - 596	99%
	<i>Sardinella hualiensis</i>	AF417341.1	246 - 523	93%
Gyrinocheilidae	<i>Gyrinocheilus aymonieri</i>	AY050541.1	247 - 521	87%
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	AF392054	1337 - 1574	86%
Salmonidae	<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF154850.1	1332 - 1552	88%
	<i>Brachymystax lenok</i>	AF113116	304 - 519	85%
Embiotocidae	<i>Embiotoca jacksoni</i>	SAE285918.1	341 - 576	86%
Bufonidae	<i>Bufo marinus</i>	AY028485.2	378 - 440	95%
Salmonidae	<i>Coregonus lavaretus</i>	AB034824.1	315 - 588	84%
Ciclidae	<i>Crenicicla lepidota</i>	AF285917.1	339 - 582	85%

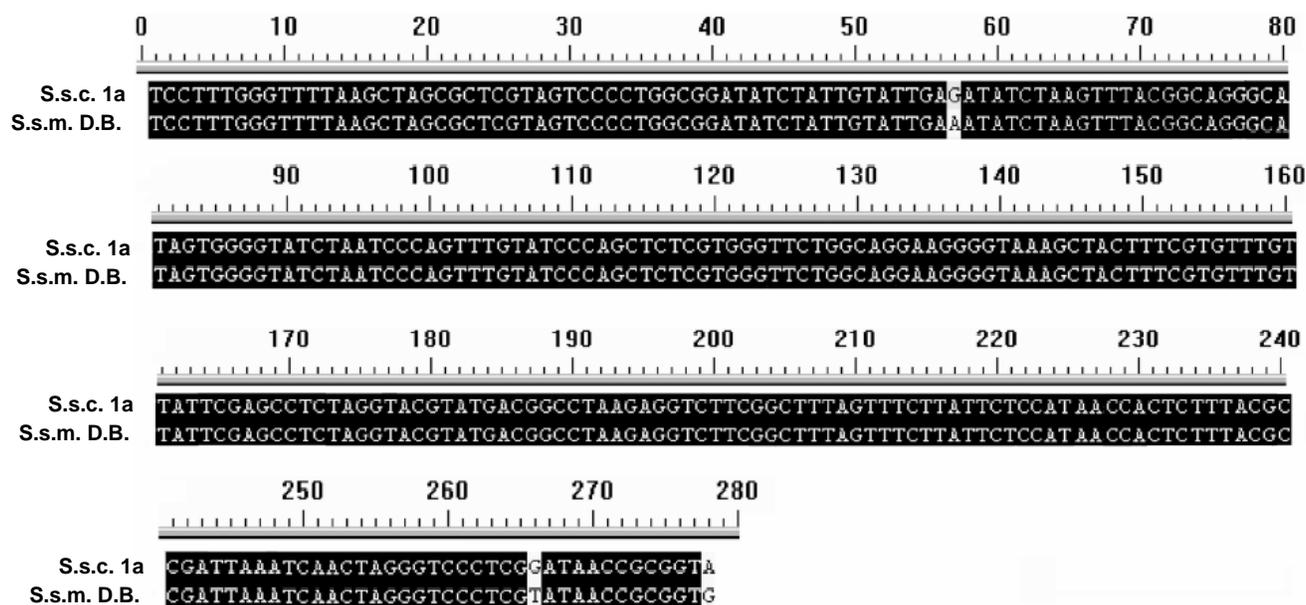


**Figura 12.** Análisis de alineamiento de la secuencia S.s.c. 2G con las secuencias reportadas en el NCBI para el gen 16S ribosomal.

**Tabla VI.** Especies que presentan mayor homología con la secuencia S.s.c. 2G (16S), obtenidas mediante alineamiento con el programa Blast (NCBI).

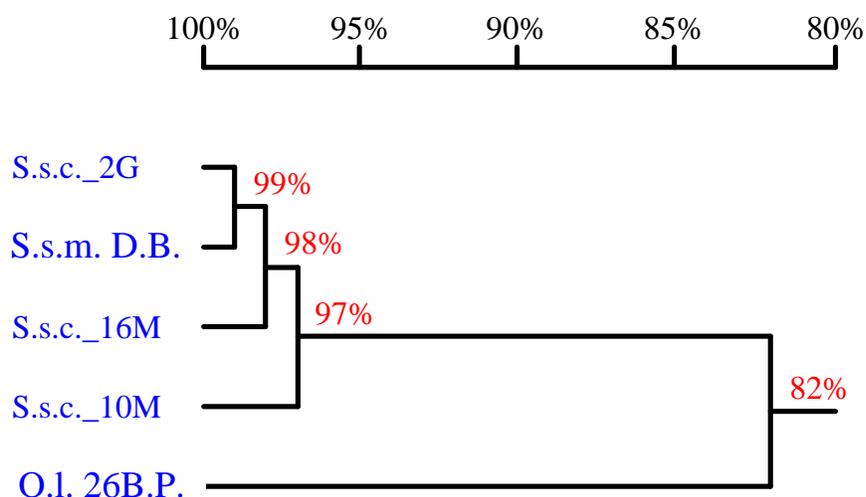
Familia	Especie	No. de acceso (NCBI)	Bases	Homología
Clupeidae	<i>S.s. melanostictus</i>	AB032554.1	2192 - 2578	98%
	<i>Clupea harengus</i>	MICH16SR	51 - 439	90%
	<i>Puntungia herzi</i>	AB025216.1	851 - 1218	92%
Cyprinidae	<i>Hybopsis cf. 2</i>	AF148364.1	192 - 558	96%
	<i>Hybopsis cf. 1</i>	AF148363.1	192 - 558	96%
	<i>Danhio pathirana</i>	DPU21385	172 - 513	93%
	<i>Hybopsis winchelli</i>	AF148365.1	192 - 558	95%
Cobitidae	<i>Macrhybopsis storeriana</i>	AF081852	2132 - 2498	95%
Cyprinidae	<i>Misgurnus anguillicaudata</i>	AF257585	2109 - 2496	96%
	<i>Margariscus margarita</i>	AF038485	1181 - 1489	96%

El análisis de alineamiento entre la secuencia del gen 12S en *S. s. caeruleus* 1a y la correspondiente de *S. s. melanostictus* se presenta en la figura 13, en donde se hace evidente la semejanza entre ambas secuencias (99% de identidad) existiendo sólo tres cambios, uno en la posición 57 (G por A), otro en la posición 266 (G por T) y el último en la posición 278 (A por G). La secuencia S.s.c. 3a que corresponde a otro amplicón secuenciado no se incluyó en el análisis dado que solo se obtuvo un solapamiento en 84 bases de 296 que constituyen la secuencia, lo que señala que la región secuenciada no corresponde completamente al fragmento específico considerado.

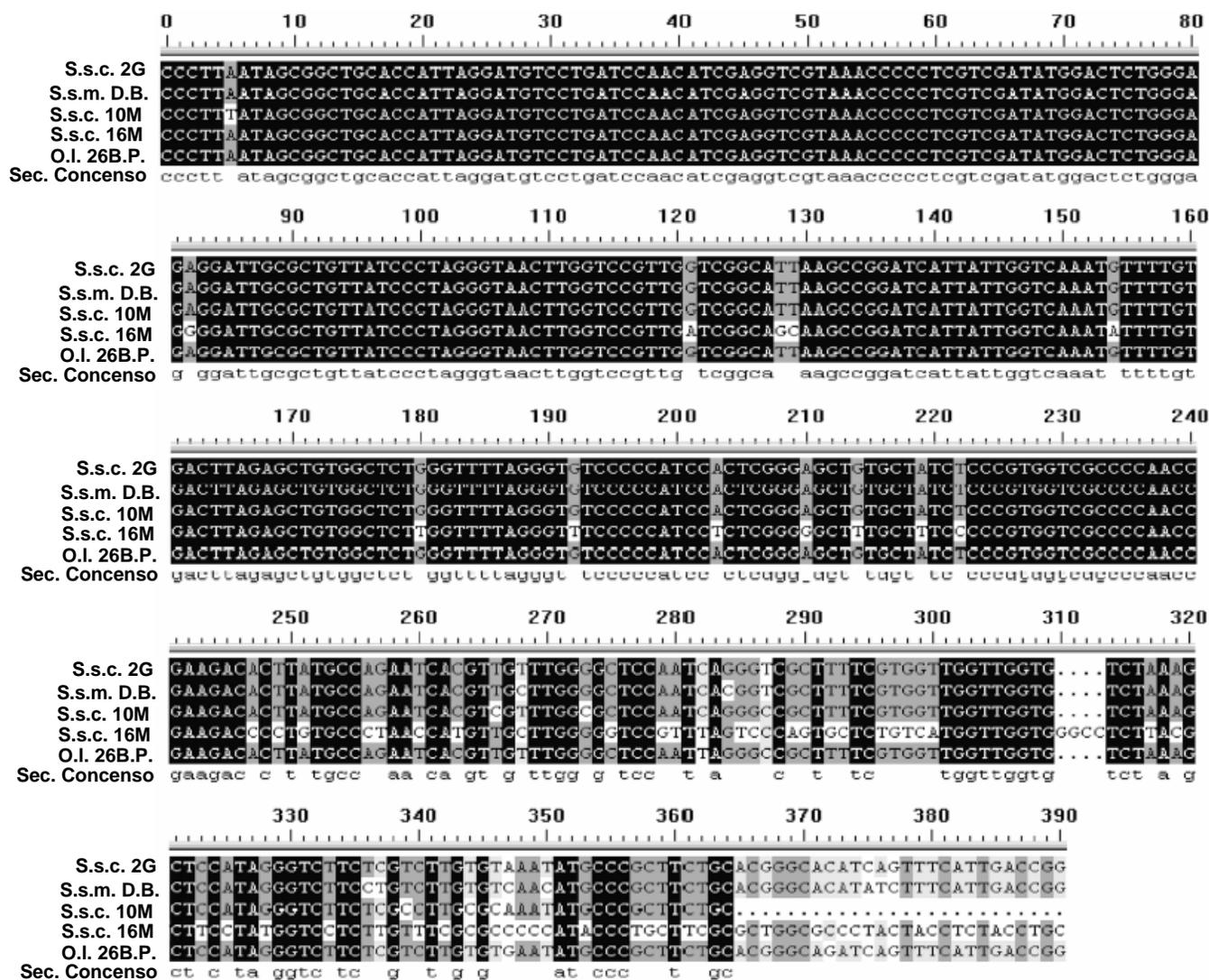


**Figura 13.** Análisis de alineamiento entre el fragmento 320-595 del gen 12S ribosomal de la sardina japonesa y la secuencia obtenida en este estudio de la sardina monterrey S.s.c. 1a.

En la figura 14 se muestra el árbol de homología obtenido del análisis de alineamiento (Figura 15) de las secuencias correspondientes a la subunidad 16S de la sardina monterrey, muestras S.s.c. 2G, S.s.c. 10M, S.s.c. 16M y la sardina crinuda *O.l.* 26 B.P., comparadas con la correspondiente de *S. s. melanostictus*, en donde se observa que entre los individuos pertenecientes a la especie (*Sardinops sagax*) existe una identidad mínima del 97% en las secuencias de nucleótidos. Cabe señalar que la sardina japonesa (*S.s.m.* DB) tiene mayor similitud con la sardina monterrey (*S.s.c.* 2G) de Guaymas (99%), mientras que en las otras sardinas monterrey de la costa pacífico de la península (Bahía Magdalena, S.s.c.10M y 16M) los niveles de similitud son ligeramente menores (97 y 98%). Sin embargo, el nivel de identidad mostrado entre el grupo de *Sardinops sagax* y *Opistonema libertate* es solo del 82%.



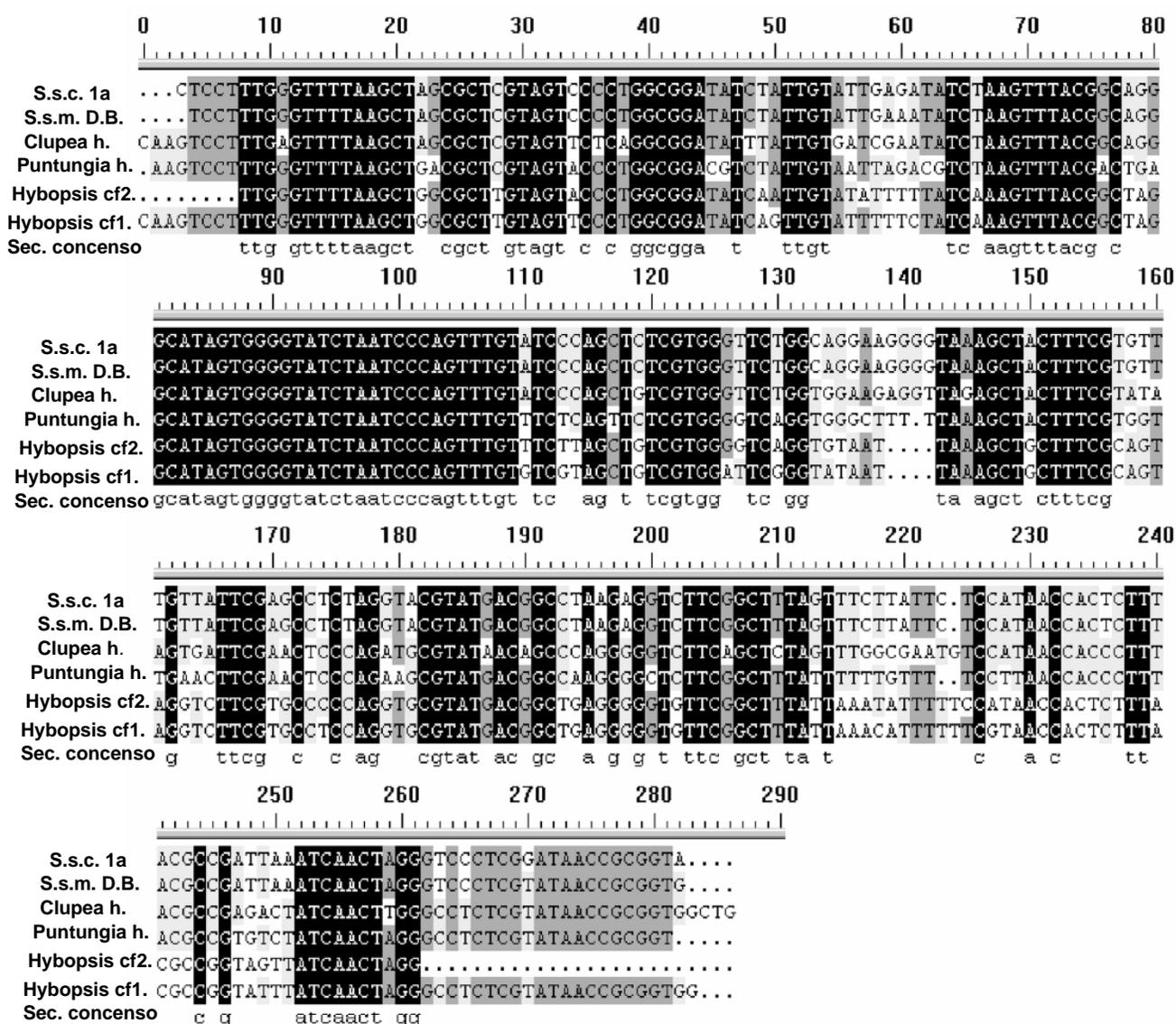
**Figura 14.** Árbol de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas de la subunidad ribosomal 16S de la sardina monterrey (*S.s.c.* 2G, *S.s.c.* 10M, *S.s.c.* 16M), la sardina crinuda (*O.l.* 26B.P.) y la secuencia correspondiente de la sardina japonesa (*S.s.m.* DB; AB032554.1) reportada por Kim *et al.* (2000).



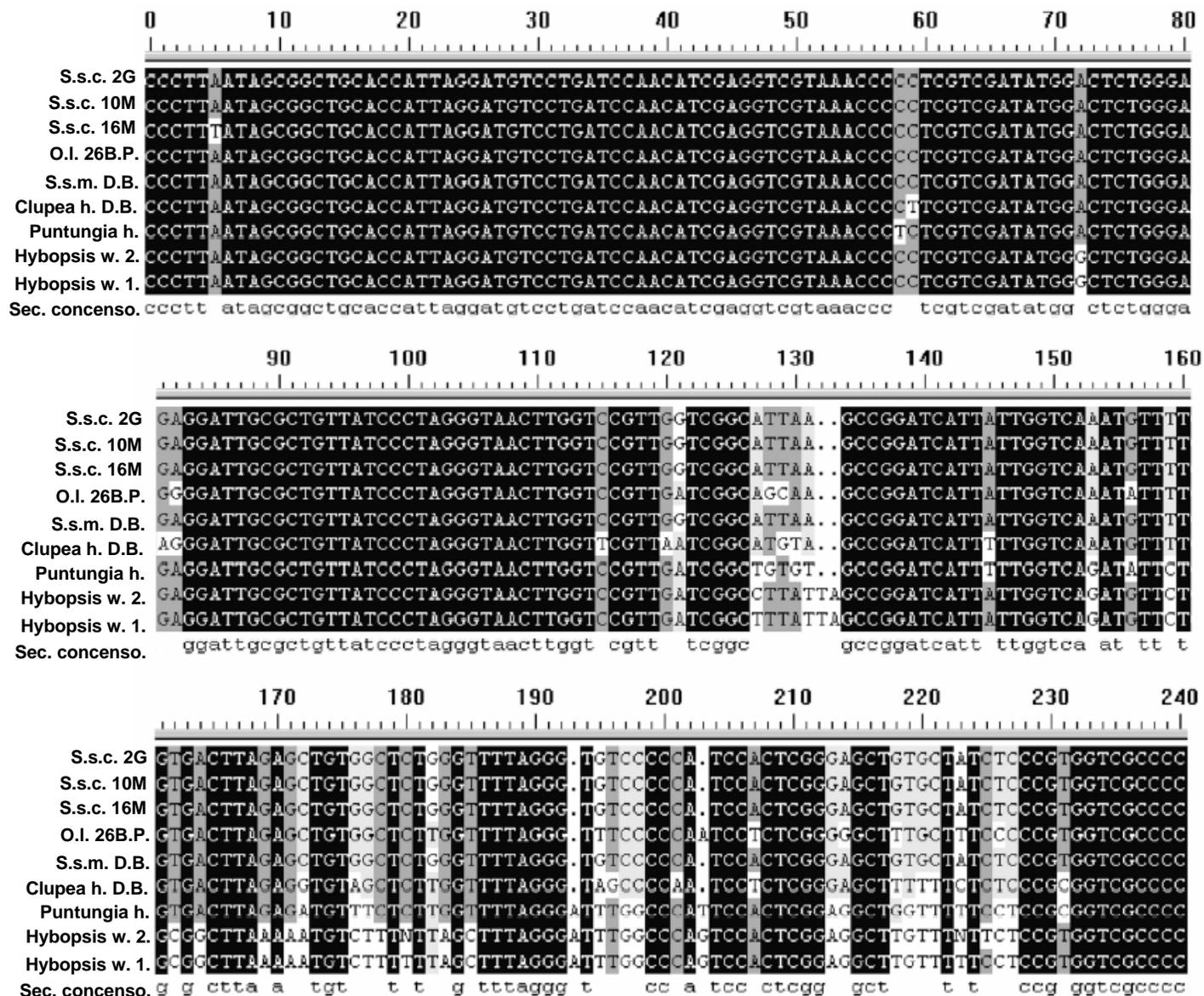
**Figura 15.** Análisis de alineamiento de las secuencias obtenidas experimentalmente para el gen 16S de la sardina monterrey (S.s.c. 2G, S.s.c. 10M, S.s.c. 16M), la sardina crinuda (O.l. 26B.P.) y la secuencia correspondiente de la sardina japonesa (S.s.m. DB; AB032554.1) reportada por Kim *et al.* (2000).

Adicionalmente se realizó un análisis de homología, utilizando las primeras 5 especies enlistadas en las tablas 5 y 6 para los genes 12S y 16S (figuras 16 y 17 respectivamente). Los árboles de homología obtenidos de los análisis anteriores se presentan en la figura 18, para la secuencia S.s.c. 1a (gen 12S), y en la figura 19 para las secuencias de sardina monterrey S.s.c. 2G, S.s.c. 10M y S.s.c. 16M, y sardina crinuda *O.l.* 26B.P (gen 16S). En las figuras 16 y 17 son evidentes regiones altamente conservadas (bloques en negro) que consisten de secuencias de nucleótidos compartidas por todas las especies consideradas, mientras que las regiones variables aparecen como zonas claras. Las regiones blanco para el diseño de sondas especie-específicas en el caso del gen 12S pueden considerarse a partir del nucleótido 55 y hasta el 251, teniendo en cuenta que la zona mas variable está contenida en el fragmento 215-255 (Figura 16). En el caso particular del gen 16S, la zona variable esta localizada a partir del nucleótido 127 y hasta el 360, considerándose la región hipervariable (blanco para el diseño de sondas especie-específicas) a partir del nucleótido 250 y hasta el 300 (Figura 17). En las figuras 18 y 19 (genes 12S y 16S respectivamente), es claro el agrupamiento de los organismos pertenecientes a *Sardinops sagax* (*S. s. caeruleus* y *S.s. melanostictus*) con niveles de identidad del 97 y 99% (genes 16S y 12S respectivamente), mientras que las especies más cercanas, también clupeidos (*S. hauliensis* y *C. harengus*) muestran niveles de homología del 82% y 87%. Si se realiza un corte en ambas figuras al nivel del 82% de homología, claramente se verá la definición de los grupos a nivel familia: Clupeidae,

Gyronocheilidae y Salmonidae para el gen 12S y Clupeidae y Cyprinidae para el gen 16S.

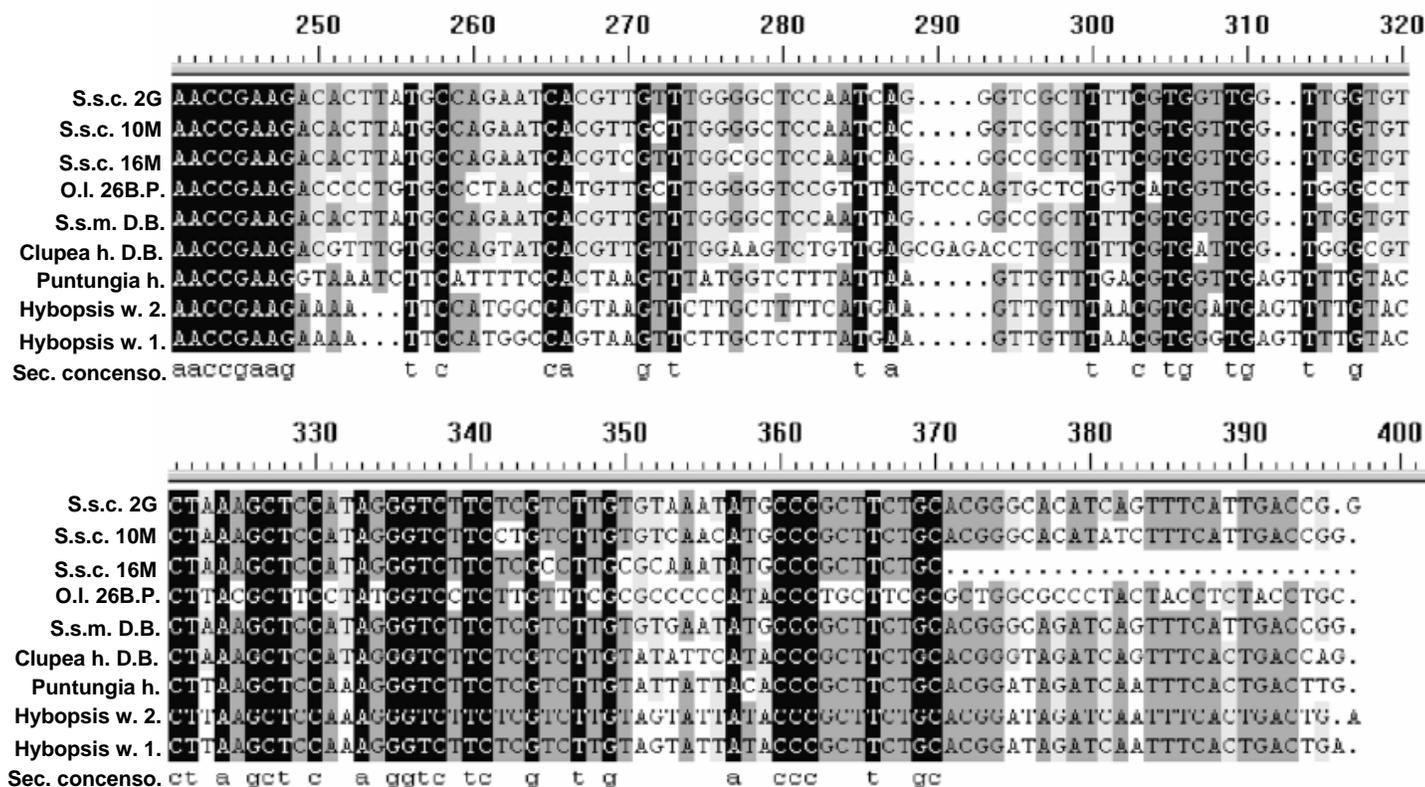


**Figura 16.** Análisis de alineamiento entre la secuencia obtenida experimentalmente para el gen 12S de sardina monterrey (S.s.c. 1a) y las secuencias con mayor homología reportadas en el NCBI (ver Tabla 5).



**Figura 17.** Análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas experimentalmente para el gen 16S de sardina monterrey (S.s.c. 2G, S.s.c. 10M, S.s.c. 16M y O.I. 26 B.P) y las secuencias con mayor homología reportadas en el NCBI (ver Tabla 6).

Continua.....



Continuación de la Figura 17.

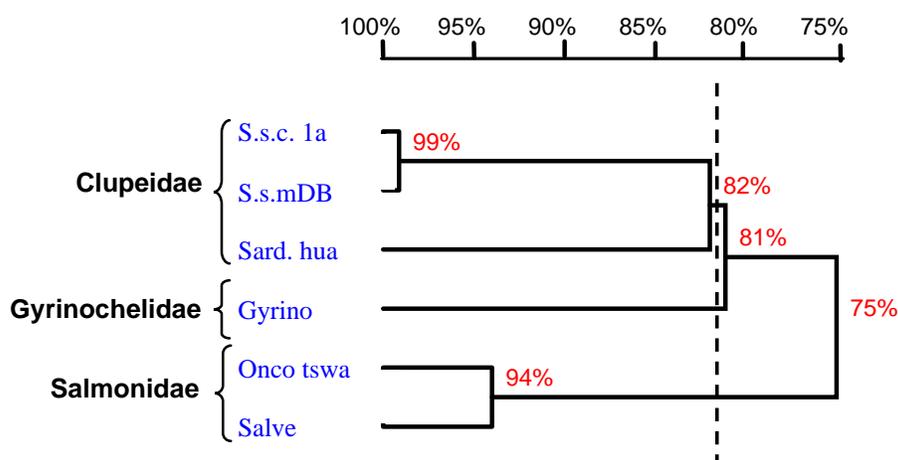
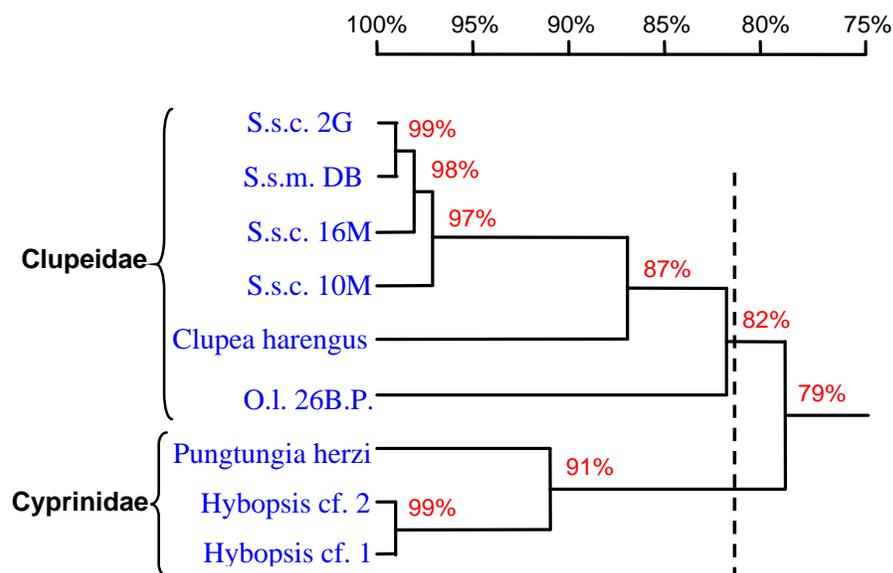


Figura 18. Árbol de homología para el gen 12S obtenido del alineamiento de la secuencia S.s.c. 1a, con las secuencias de mayor homología encontradas mediante análisis Blast (primeras 5 especies enlistadas en la tabla 5).



**Figura 19.** Árbol de homología para el gen 16S obtenido del alineamiento de las secuencias S.s.c. 2G, S.s.c. 10M, S.s.c. 16M, y O.I. 26BP, con las secuencias de mayor homología encontradas mediante análisis Blast (primeras 5 especies enlistadas en la tabla 6).

## 7. DISCUSIÓN

El conocimiento de la dinámica de las poblaciones naturales es fundamental para lograr su manejo y aprovechamiento con bases científicas. Algunos métodos normalmente empleados en la identificación de stocks, como los análisis morfológicos y la identificación y cuantificación de productos de desove (huevos y larvas), pueden proporcionar información valiosa, sin embargo, generalmente requieren la inversión de mucho tiempo y esfuerzo. Este tipo de problemas fueron previamente discutidos por Whitehead (1985), quién consideró que parte del problema al identificar clupeidos, principalmente aquellas especies de distribución tropical y subtropical, donde la diversidad es mayor, se debe a que se requiere un buen trabajo de análisis microscópico ya que existen géneros cuya taxonomía es poco conocida.

El uso de las cristalinas para estudios taxonómicos y de estructura poblacional ha sido empleado continuamente desde los inicios de la electroforésis (Whitmore 1990), las diferencias interespecíficas en los patrones de las proteínas del ojo de numerosos peces marinos y de agua dulce esta bien documentada. En este trabajo, los análisis de IEF de cristalinas, realizados en tres especies de la Familia Clupeidae y una de la Familia Gerreidae, revelaron una estrecha distancia (0.05) y en consecuencia una elevada identidad genética (0.94), entre las muestras de *S.s. caeruleus* colectadas en la misma zona (Bahía Magdalena) pero en diferente fecha (Mayo y Junio), al comparar la identidad entre estas muestras y las colectadas en la Bahía de Guaymas, se observó que son muy similares (0.71) no

obstante, el análisis de IEF permitió determinar una menor identidad con especies de otros géneros de clupeidos. Lo anterior nos permite inferir que esta técnica, aunque permite discriminar entre especies, incluso taxonómicamente cercanas, presenta limitaciones para diferenciar claramente entre stocks de un misma especie (como ocurrió con las muestras de Bahía Magdalena y Guaymas). Una situación similar ha sido reportada por Daníelsdóttir *et al.* (1999), quienes analizaron el patrón electroforético de cristalinas de peces del género *Sebastes* (*S. marinus* y *S. mentella*), obteniendo patrones electroforéticos idénticos y concluyendo que el análisis de cristalinas puede ser usado para discriminar entre especies cercanas al género *Sebastes*, pero no para la diferenciación de stocks de *S. marinus* y *S. mentella*. Aunque esta técnica facilita el trabajo de identificación, su aplicación se ve limitada al empleo de organismos lo suficientemente grandes para poder realizar la disección del lente, siendo técnicamente imposible su empleo para identificar huevos y larvas. Por otra parte, es aplicable con cierta confianza en organismos juveniles y adultos, siendo su principal ventaja sobre los análisis de aloenzimas por ejemplo, que como se trata de proteínas fibrosas la posibilidad de degradación es muy baja, lo que no sucede con otros tejidos blandos.

Los estudios de sistemática molecular, utilizando secuencias de ARN ribosomal y analizando su estructura secundaria, han sido previamente discutidos por Hixon y Brown (1986), Wheeler y Honeycutt (1988), Larson y Wilson (1989), Mindell y Honeycutt (1990), Dixon y Hillis (1993), Vawter y Brown (1993), Olsen y Woese (1993) y Ortí *et al.* (1996), incluso Hillis y Dixon (1991), han sugerido que los

genes de ARN ribosomal pueden utilizarse para analizar relaciones filogenéticas entre grupos cuya divergencia no sea mayor a 65 millones de años.

En el presente trabajo se logró obtener ADN genómico de muestras fijadas con etanol 70%, tanto recientes como con 4 años de preservación, esto resulta alentador, en virtud de que podemos aspirar a obtener ADN de buena calidad de muestras de sardina que tienen varios años de haber sido preservadas y permanecen almacenadas en las colecciones científicas.

Los pares de primers diseñados y utilizados en el presente estudio, tanto del gen 12S como del 16S, permitieron amplificar fragmentos de aproximadamente 297 y 476 pares de bases (respectivamente), los cuales al ser secuenciados y alineados, presentaron 99% de homología con las secuencias de ambas subunidades ribosomales, reportadas por Inoue *et al.* (2000) en *S.s. melanostictus*. En virtud de que las secuencias parciales obtenidas de *S.s. caeruleus* fueron prácticamente idénticas a las reportadas para *S.s. melanostictus*, se puede inferir que al igual que en esta especie, ambas regiones se localizan entre los genes de la ARNt<sup>Phe</sup> y ARNt<sup>Leu</sup>, separados por el gene de ARNt<sup>Val</sup>, y que las secuencias parciales obtenidas pueden ser de utilidad en determinación de la estructura secundaria de ambas subunidades ribosomales en la sardina del Pacífico *S.s. caeruleus*.

Al comparar las secuencias de *S.s. caeruleus* con otras especies de clupeidos, se obtuvieron menores porcentajes de homología, determinando que las secuencias de la subunidad 12S, presentaron 82% de homología con *S. hualiensis*, y por su parte las secuencias de la subunidad 16S, presentaron 87% de homología con *C. harengus*. En ambos casos, esa menor homología es suficiente para discriminar

claramente las especies del género *Sardinops* de las de otros géneros, aún de la misma Familia, y más claramente de otras Familias de peces. Es difícil establecer en este momento el nivel de homología entre las secuencias ribosomales para que una especie pueda ser definida como tal. Por ejemplo, en levaduras de la clase Ascomycetes se considera que una complementariedad del 70% o mayor en la reasociación en el ADN nuclear define la misma especie, mientras que variaciones del 40 al 70% definen variedades o subespecies (Kurtzman y Robnett 1998). Sin embargo, la desventaja de la reasociación de ADN nuclear radica en que es necesario considerar el apareamiento del ADN nuclear entre todos los aislados (individuos) considerados en el estudio y, por otro lado, la resolución es limitada debido a la corta distancia genética existente entre especies hermanas. Para solventar estos inconvenientes, se han buscado y establecido nuevas técnicas, no solo aplicables a levaduras, sino a la diversidad de organismos. Entre ellas se han considerado la secuenciación, las comparaciones entre el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo en la amplificación aleatoria de ADN (random amplified polymorphic DNA, RAPD por sus siglas en inglés). De ellas, la secuenciación parece ser la técnica más robusta ya que las comparaciones entre especies y morfotipos se realiza fácilmente y, con una selección apropiada de genes, pueden ser fácilmente resueltas relaciones genéticas cercanas o distantes. Por ejemplo, en estudios en los que se consideró el dominio variable (300 pb) cercano al extremo 5' de la subunidad ribosomal mayor en levaduras (26S) se estimó que una variación menor al 1% considera cepas que pertenecen a la misma especie, mientras que la diferenciación entre

especies biológicas es aquella mayor al 1%, por lo que empíricamente se estableció una medida para el reconocimiento de especies (Kurtzman y Robnett 1998). Sin embargo, para que estas técnicas sean confiables para la determinación de relaciones filogenéticas, en los estudios deben considerarse numerosos taxos.

De acuerdo a nuestros resultados, que deben considerarse como preliminares, el alto grado de homología observado en las secuencias de ambos genes ribosomales (12S y 16S) entre *S.s. caeruleus* y *S.s. melanostictus*, concuerda con modelo de dispersión propuesto por Bowen *et al.* (1998) con respecto al posible intercambio genético de las sardinas del Pacífico oriental y occidental, aunque para ser estrictamente concluyentes y determinar si existen 5 especies del género *Sardinops*, o en realidad se trata de una especie a nivel mundial con variedades regionales, es necesario analizar con las mismas herramientas un número considerable de individuos tanto de la sardina del Pacífico nororiental como de la japonesa, además de las otras variedades geográficas (sardina del Pacífico suroriental *S. s. sagax*, sardina Australiana *S. s. neopilchardus* y sardina Sud-Africana *S. s. ocellatus*). Lo anterior enfatiza la importancia del presente estudio, pues de él se derivan los primeros reportes de secuencias de los genes ribosomales 12S y 16S en la sardina monterrey (*S.s. caeruleus*) y la sardina crinuda (*O. libertate*).

Por otro lado, en los árboles de homología (figuras 18 y 19) se define claramente el nivel de familia en un 82% de homología, observándose los géneros de la familia Clupeidae en niveles de homología del 82 al 87%. Entre los géneros de las

otras familias (Salmonidae y Cyprinidae) los porcentajes de homología son del 91 al 94% (figuras 19 y 18 respectivamente). Esto nos da una idea de la alta variabilidad dentro de la familia Clupeidae, lo que como consecuencia reduce la significancia de los porcentajes de homología (97-99%) encontrados entre los individuos de *S. sagax* (S.s.c y S.s.m.).

## 8. CONCLUSIONES

1. Los análisis de cristalinas mediante electroforésis de isoelectroenfoque permiten la identificación rápida al nivel de especie, sin embargo, con esta técnica no es posible discriminar entre stocks, y su uso estaría limitado al análisis de organismos juveniles y adultos. Sin embargo, debido a la naturaleza de las cristalinas (no fácilmente degradables) y el fácil desarrollo del método, hacen de esta técnica una buena opción para la identificación de especies.

2. Se logró aislar ADN de muestras de tejido muscular fijadas recientemente en etanol al 70%, y de 4 años de antigüedad, lo que amplía la posibilidad de realizar estudios de variabilidad genética y dinámica poblacional tanto actuales como históricos.

3. Aunque no se obtuvieron resultados sobresalientes en la obtención de ADN de alta calidad a partir de muestras fijadas con formol al 8% con ninguno de los métodos ensayados (clorofomo/alcohol isoamílico y/o Chelex), cabe mencionar que la posibilidad de obtener un método estandarizado para este tipo de muestras es uno de los objetivos inmediatos del grupo de trabajo.

4. Los oligonucleotidos probados en este trabajo, para ambas subunidades ribosomales (12S y 16S) permitieron la amplificación de secuencias parciales específicas de los genes blanco, cuya homología fue casi del 100% entre las

muestras de sardina monterrey *S. s. caeruleus* y sardina japonesa *S. s. melanostictus*. Así mismo, mediante el uso de estas herramientas se fijó un porcentaje de homología del 82% que define familias, lo que hace posible la delimitación de especies aún dentro de una misma familia con un alto grado de confianza.

5. Los oligonucleótidos diseñados pueden ser considerados universales para la amplificación específica de regiones hipervariables de los genes ribosomales 12S y 16S en peces y algunos otros vertebrados como anfibios.

6. Mediante el análisis de alineamiento de las secuencias obtenidas es posible seleccionar regiones especie-específicas que son excelentes candidatos para el diseño de oligos especie-específicos o sondas que nos permitan la inmediata identificación de especies particulares en una muestra de arrastre de plancton, lo que es un objetivo inmediato del grupo de trabajo.

7. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando la metodología desarrollada, sugieren un posible intercambio genético entre *S. s. caeruleus* y *S. s. melanostictus*, para ser concluyentes a este respecto es necesario considerar en estudios futuros las otras variedades geográficas de *Sardinops sagax* (australiana, sudafricana y chilena). Adicionalmente, podrían considerarse otro tipo de estudios genéticos como los análisis de reasociación de ADN nuclear para confirmar esta hipótesis.

8. Aunque no fue posible probar ambos marcadores en muestras de huevos y larvas de *S.s.caeruleus*, los resultados obtenidos hasta ahora permiten visualizar un panorama positivo en la búsqueda de una estrategia para identificar de manera rápida y confiable muestras de productos de desove.

9. Las secuencias obtenidas en este trabajo, representan el primer registro de secuencias de las subunidades menor (12S) y mayor (16S) en la sardina del Pacífico (*S. s. caeruleus*) y la sardina crinuda (*O. libertate*).

## 9. APÉNDICES

### Apéndice 1. Métodos analíticos.

#### 9.1 Isoelectroenfoque (IEF)

##### 9.1.1 Preparación de soluciones stock para IEF.

###### 1.- Monómero concentrado

acrilamida 24.25%

bis (N,N' –Methylene-bis-acrylamide) 0.75%

Disolver 24.25 g de acrilamida y 0.75 g de bis-acrilamida en agua destilada, aforando a un volumen final de 100 mL y filtrar a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . La solución puede mantenerse en refrigeración (4°C) y protegida de la luz hasta un mes.

###### 2.- Riboflavin- 5' –fosfato (FMN) 1%

50 mg de riboflavin- 5' –fosfato

50 mL de agua destilada

Esta solución pueden almacenarse hasta un mes manteniéndola a 4°C y protegida de la luz.

###### 3.- Persulfato de amonio 10%

100 mg de persulfato de amonio

1 mL de agua destilada

Verificar que el persulfato de amonio este completamente disuelto antes de usarlo.

###### 4.- Glicerol 25%

Adicionar 25 mL de glicerol en 50 mL de agua destilada, aforar a 100 mL

#### 5.- TEMED (N,N' –tetramethylene-ethylenediamine) (Bio-Rad)

Utilizar el TEMED directamente de la botella, almacenandolo a 4°C y protegido de la luz.

#### 9.1.2. Preparación de geles de poliacrilamida de 125 x 65 x 0.4 mm para IEF

##### 1.- Solución de monómero-anfolinas

5.5 mL de agua destilada

2.0 mL de monómero concentrado

2.0 mL de glicerol 25%

0.5 ml de Ampholyte 3/10

##### 2.- Solución de catálisis

50 µL de FMN 0.1%

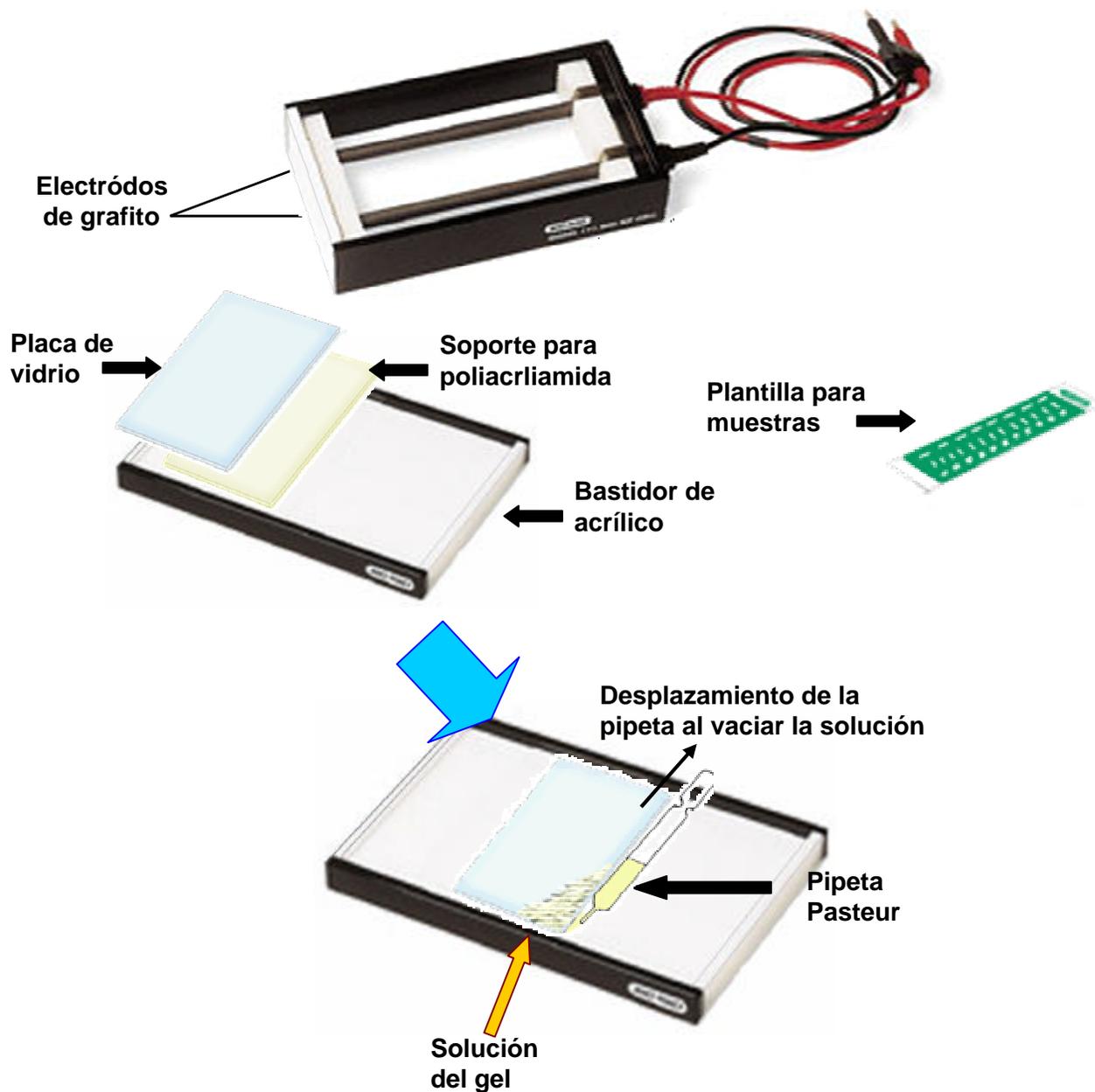
15 µL de persulfato de amonio 10%

3.0 µL de TEMED (Bio-Rad)

Nota: Las anfolinas básicas (pH > 8.0) interfieren con la adhesión del gel a la película de soporte para poliacrilamida. Se recomienda incrementar la concentración de persulfato de amonio a 0.7 mg/mL en la solución final del gel (adicionando 70 µL de persulfato de amonio 10% para soluciones de 10 mL).

La solución del gel fue adicionada como se muestra en la figura 20, colocando una película de soporte para poliacrilamida con la parte hidrofóbica contra la placa de vidrio y la parte hidrofílica sobre el bastidor de acrílico, la solución fue vertida con una pipeta pasteur de plástico evitando la formación de burbujas. Para acelerar la polimerización del gel, el bastidor fue iluminado con una lámpara fluorescente durante 40 minutos, al término de este periodo el gel fue separado del bastidor para cargar las muestras, colocando la plantilla para las muestras sobre la superficie del gel. La electroforesis se llevo a cabo durante 120 minutos a 100V, 10mA, 1W. Usando una fuente de poder Bio-Rad POWER/PAC 1000.

**Cámara 111 Mini  
IEF Cell *BIO-RAD***



Cámara para electroforesis de isoelectroenfoco utilizada en los experimentos con cristalininas de peces.

### 9.1.3 Preparación de soluciones para fijado, teñido y desteñido

#### 1.- Solución de fijación (100 mL)

Adicionar: 4% de ácido sulfosalicílico  
12.5% de ácido tricloroacético  
30% de metanol

Aforar a 100 mL con agua destilada. Sumergir los geles en esta solución durante 30 minutos

#### 2.- Solución de tinción (100 mL)

Adicionar: 27% de isopropanol o etanol  
10% de ácido acético  
0.04% de azul brillante de Coomassie R-250  
0.5% de  $\text{CuSO}_4$

Disolver el  $\text{CuSO}_4$  en agua destilada antes de adicionar el alcohol, aforar a 100 mL. Sumergir los geles en la solución durante 1 - 2 horas.

#### 3.- Soluciones para desteñir (100 mL).

##### Solución I

Adicionar: 12% de isopropanol o etanol  
7% de ácido acético  
0.5% de  $\text{CuSO}_4$

Disolver el  $\text{CuSO}_4$  antes de adicionar el alcohol y aforar a 100 mL, sumergir el gel en la solución y mantener en agitación suave, hacer recambios de la misma hasta que el fondo del gel se torne claro.

##### Solución II

Adicionar: 25% de isopropanol o etanol

7% de ácido acético

Aforar a 100 mL. Sumergir los geles en esta solución para eliminar los restos de la tinción y del  $\text{CuSO}_4$ .

## **9.2 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford**

### 9.2.1 Preparación de solución stock (reactivo de Bradford)

1. Disolver 100mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%.
2. Agregar 100 mL de ác. fosfórico al 85% y aforar a 1000 mL con agua destilada.

### 9.2.2 Curva estándar

1. Preparar una solución de albúmina sérica bovina (ABS fracción V) a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
2. Realizar las siguientes diluciones: 0, 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{g}$  de proteína/mL. A 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución se le adiciona 1 mL de reactivo de Bradford y se mezcla.
3. Después de 5 min. de incubación a temperatura ambiente, se leen las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm en cubetas de 1mL.
4. La concentración de proteína se grafica contra la absorbancia correspondiente para obtener una curva patrón que se utilizará como referencia para calcular la concentración de proteína de las muestras problema.

### 9.2.3 Cuantificación de proteínas

1. Se realizó una dilución 1:500 (2  $\mu\text{L}$  del extracto + 998 de agua destilada) de cada muestra
2. En un tubo de 1.5 mL, se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de la dilución + 800  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford

3. Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro a 595nm para determinar la concentración de proteína.

### ***9.3 Preparación de geles de agarosa para electroforesis de ADN.***

1. Pesar 1 gr. de agarosa grado Biología Molecular
2. Disolver la agarosa en 100 mL de Buffer TBE 1X ( Tris 108 gr., ác. Bórico 55 gr., EDTA 0.5 M pH 8.0 20 mL. Aforar a un litro) mediante calentamiento.
3. Retirar del calor y dejar enfriar unos minutos, adicionar 3  $\mu$ L de EtBr 10mM y continuar mezclando.
4. Vaciar la solución en el molde donde se dejara enfriar completamente.

### ***9.4 Protocolo de purificación de ácidos nucleicos utilizando silica gel.***

1. Hacer una electroforesis, con el volúmen total del producto de PCR en un gel de agarosa 1.0% en buffer TAE IX (50X: pH 7.8; Tris-HCl 40 mM; ácido acético glacial 0.14%: EDTA 1mM, pH 8.0)
2. Pesar previamente un tubo de 1.5 mL vacío
3. Cortar la banda que contiene el ADN y colocarla en el tubo de 1.5 mL.
4. Pesar nuevamente el tubo y calcular el peso del gel
5. Multiplicar por 3, y este será el volúmen en  $\mu$ L de NaI 6M que se adicionaran al tubo
6. Adicionar el NaI e incubar a 55°C de 5-15 minutos para desgelificar el gel
7. Adicionar 10-15  $\mu$ L de sílica (glass milk, resuspendida en agua destilada)
8. Mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente 15 minutos
9. Centrifugar a 8940xg durante 1 minuto
10. Descartar sobrenadante
11. Lavar tres veces con 500  $\mu$ L de buffer New Wash frío (1X 50% ethanol, 0.1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7.2; 1mM EDTA, almacenado a -20°C),

resuspendiendo el pellet de sílica, centrifugar aprox. a 8940xg durante 1 minuto y descartar sobrenadante

12. Secar el pellet para eliminar los restos de líquido
13. Adicionar 20-30  $\mu$ L de agua destilada estéril y resuspender el pellet
14. Incubar a 55°C, 15 minutos
15. Centrifugar a 8940xg rpm durante 1 minuto y recuperar el sobrenadante, que contiene el ADN
16. Repetir los pasos 13 y 15 una o dos veces para incrementar el rendimiento
17. Centrifugar a 8940xg durante 1 minuto y recuperar el sobrenadante en tubos de 0.5 mL para eliminar restos de sílica.



### Apéndice 3. Secuencias de nucleótidos obtenidas mediante la secuenciación de productos de PCR utilizando primers específicos.

**Secuencia:** S.s.c. 1a.

**Gen:** 12S

**Especie:** *Sardinops sagax caeruleus*

**Lugar y fecha de colecta:** Bahía de Guaymas, Sonora, México. Octubre, 2002.

**No. de Organismo:** 4

**Lugar y fecha de secuenciación:** MACROGEN, Seúl, Corea, Enero, 2003.

**No. de bases:** 279

**Orientación:** (-)

```

1      CTCCTTTGGG TTTTAAGCTA GCGCTCGTAG TCCCCTGGCG GATATCTATT GTATTGAGAT
61     ATCTAAGTTT ACGGCAGGGC ATAGTGGGGT ATCTAATCCC AGTTTGTATC CCAGCTCTCG
121    TGGGTTCCTGG CAGGAAGGGG TAAAGCTACT TTCGTGTTTG TTATTTCGAGC CTCTAGGTAC
181    GTATGACGGC CTAAGAGGTC TTCGGCTTTA GTTTCTTATT CTCCATAACC ACTCTTTACG
241    CCGATTAAAT CAACTAGGGT CCCTCGGATA ACCGCGGTA

```

**Secuencia:** S.s.c. 3a.

**Gen:** 12S

**Especie:** *Sardinops sagax caeruleus*

**Lugar y fecha de colecta:** Bahía de Guaymas, Sonora, México. Octubre, 2002.

**No. de Organismo:** 5

**Lugar y fecha de secuenciación:** MACROGEN, Seúl, Corea, Enero, 2003.

**No. de bases:** 272

**Orientación:** (-)

```

1      AAGTTCCTTT GGGTTTTAAG CTAGCGCTCG TAGTCCCCTG GCGGATATCT ATTGTATTGA
61     GATATCTAAG TTTACGGAGG CGATAGTCGG GGTATCCTAA TCACCAGTCC CGTATCCCAG
121    CCTCCTCCGT CGGGTTTCTG GCAGCGAAGG GGTAAAAGCC TACCTTCCCG AGGTTTGCTA
181    TCTATAGTCT TAGGCACGTA TGACGGCCCT AACAGGTCTT CGGGCTCTAG CCTCGCCATT
241    CTTCCTAAC CCACTTCTTT TACGACACGA AT

```

**Secuencia:** S.s.c. 2G.

**Gen:** 16S

**Especie:** *Sardinops sagax caeruleus*

**Lugar y fecha de colecta:** Bahía de Guaymas, Sonora, México. Octubre, 2002.

**No. de Organismo:** 4

**Lugar y fecha de secuenciación:** MACROGEN, Seúl, Corea, Enero, 2003.

**No. de bases:** 387

**Orientación:** (-)

```

1      CCCTTAATAG CGGCTGCACC ATTAGGATGT CCTGATCCAA CATCGAGGTC GTAAACCCCC
61     TCGTCGATAT GGACTCTGGG AGAGGATTGC GCTGTTATCC CTAGGGTAAC TTGGTCCGTT
121    GGTCGGCATT AAGCCGGATC ATTATTGGTC AAATGTTTTG TGACTIONAG CTGTGGCTCT
181    GGGTTTTAGG GTGTCCCCCA TCCACTCGGG AGCTGTGCTA TCTCCCGTGG TCGCCCCAAC
241    CGAAGACACT TATGCCAGAA TCACGTTGTT TGGGGCTCCA ATCAGGGTCG CTTTTCGTGG
301    TTGGTTGGTG TCTAAAGCTC CATAGGGTCT TCTCGTCTTG TGTAATATG CCCGCTTCTG
361    CACGGGCACA TCAGTTTCAT TGACCGG

```

**Secuencia:** S.s.c. 10M.

**Gen:** 16S

**Especie:** *Sardinops sagax caeruleus*

**Lugar y fecha de colecta:** Bahía Magdalena, México. Junio, 2002.

**No. de Organismo:** 3

**Lugar y fecha de secuenciación:** MACROGEN, Seúl, Corea, Enero, 2003.

**No. de bases:** 387

**Orientación:** (-)

```

1      CCCTTAATAG CGGCTGCACC ATTAGGATGT CCTGATCCAA CATCGAGGTC GTAAACCCCC
61     TCGTCGATAT GGACTCTGGG AGAGGATTGC GCTGTTATCC CTAGGGTAAC TTGGTCCGTT
121    GGTCGGCATT AAGCCGGATC ATTATTGGTC AAATGTTTTG TGACTIONAG CTGTGGCTCT
181    GGGTTTTAGG GTGTCCCCCA TCCACTCGGG AGCTGTGCTA TCTCCCGTGG TCGCCCCAAC
241    CGAAGACACT TATGCCAGAA TCACGTTGCT TGGGGCTCCA ATCACGGTCG CTTTTCGTGG
301    TTGGTTGGTG TCTAAAGCTC CATAGGGTCT TCCTGTCTTG TGCAACATG CCCGCTTCTG
361    CACGGGCACA TATCTTTCAT TGACCGG

```

**Secuencia:** S.s.c. 16M.

**Gen:** 16S

**Especie:** *Sardinops sagax caeruleus*

**Lugar y fecha de colecta:** Bahía Magdalena, México. Mayo, 2002.

**No. de Organismo:** 3

**Lugar y fecha de secuenciación:** MACROGEN, Seúl, Corea, Enero, 2003.

**No. de bases:** 362

**Orientación:** (-)

```

1      CCCTTTATAG CGGCTGCACC ATTAGGATGT CCTGATCCAA CATCGAGGTC GTAAACCCCC
61     TCGTCGATAT GGACTCTGGG AGAGGATTGC GCTGTTATCC CTAGGGTAAC TTGGTCCGTT
121    GGTTCGGCATT AAGCCGGATC ATTATTGGTC AAATGTTTTG TGACTTAGAG CTGTGGCTCT
181    GGGTTTTAGG GTGTCCCCCA TCCACTCGGG AGCTGTGCTA TCTCCCGTGG TCGCCCCAAC
241    CGAAGACACT TATGCCAGAA TCACGTCGTT TGGCGCTCCA ATCAGGGCCG CTTTTCGTGG
301    TTGGTTGGTG TCTAAAGCTC CATAGGGTCT TCTCGCCTTG CGCAAATATG CCCGCTTCTG
361    C

```

**Secuencia:** O.P. 26B.P.

**Gen:** 16S

**Especie:** *Opistonema libertate*

**Lugar y fecha de colecta:** Bahía de La Paz, México. Abril, 2002.

**No. de Organismo:** 1

**Lugar y fecha de secuenciación:** MACROGEN, Seúl, Corea, Enero, 2003.

**No. de bases:** 392

**Orientación:** (-)

```

1      CCCTTAATAG CGGCTGCACC ATTAGGATGT CCTGATCCAA CATCGAGGTC GTAAACCCCC
61     TCGTCGATAT GGACTCTGGG AGGGGATTGC GCTGTTATCC CTAGGGTAAC TTGGTCCGTT
121    GATCGGCAGC AAGCCGGATC ATTATTGGTC AAATATTTTG TGACTTAGAG CTGTGGCTCT
181    TGGTTTTAGG GTTTCCCCCA ATCCTCTCGG GGGCTTTGCT TTCCCCCGTG GTCGCCCAA
241    CCGAAGACCC CTGTGCCCTA ACCATGTTGC TTGGGGGTCC GTTTAGTCCC AGTGCTCTGT
301    CATGGTTGGT GGGCCTCTTA CGCTTCCTAT GGTCCCTTG TTTTCGCGCC CCATACCCTG
361    CTTTCGCGCTG GCGCCCTACT ACCTCTACCT GC

```

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

Bakun, A. 1990. Global climate change and intensification of coastal ocean upwelling. *Science* 247: 198-201. Citado en : Bowen, B y Grant, S. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops spp.*): assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones.

Bakun, A. y Cury, P. 1999. The “school trap”: a mechanism promoting large-amplitude out-of-phase population oscillations of small pelagic fish species. *Ecology Letters* (2): 349-351 pp.

Beverton, R. J. H. 1983. Science and decision-making in fisheries regulations. *FAO Fish. Rep.* 291 (3): 919-936 pp. Citado en: Casas-Valdez, M. y Ponce-Díaz, G. (Eds.) 1996. Vol. 1. (Pesquería de pelágicos menores).

Bowen, B y Grant, S. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops spp.*): assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution*, 51 (5) 1601-1610 pp.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254 pp.

Casas-Valdez, M. y Ponce-Díaz, G. (Eds.) 1996. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Vol. 1. 317-350 pp.

Cadrin, S. y Friedland, K. 1999. The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fisheries Research*. 43: 129-139 pp.

Chavez, F. P., Ryan, J., Lluch-Cota, S.E. y Ñiquen, M. 2003. From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *Science*, 299, 217 - 221

Cisneros-Mata, M. A., M.O. Nevárez-Martínez, G. Montemayor-López, J.P. Santos-Molina y R. Morales-Azpeitia. 1991. *Pesquería de sardina en el Golfo de California 1988/89 - 1989/90*. SePesca, Inst. Nal. De la Pesca. CRIP Guaymas. Guaymas. Son. 80 p.

Clark, F. 1947. Analysis of populations of the Pacific Sardine on the basis of vertebral counts. Division of Fish and Game, Bureau of marine fisheries. State of California. *Fish Bulletin No. 65*. 5-9 pp

Daníelsdóttir, A., Johansen, T., Naevdal, G. Rehbin, H. Schmidt, C. Stefansson, M. y Trautner, J. 1999. Implementation and Development of Genetic Markers. Deliverable 19. En: EU REDFISH Project (QLK5-CT1999-01222): Population structure, reproductive strategies and demography of redfish (Genus *Sebastes*) in the Irminger Sea and adjacent waters (ICES V, XII y XIV; NAFO 1). 1-4 p.

Davies, M. y Cook, B. A. 2001. Status of the genetic and biochemical análisis of marine organisms in South Africa .

En línea: <http://www.nrf.ac.za/publications/marinerep/genetic.htm>

Dixon, M y Hillis, D. 1993. Ribosomal RNA secondary structure: compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 10: 256-267 pp.

DNAMAN versión 4.15 Lynnon BioSoft. Copyright 1994-1999.

EPA (Environmental Protection Agency), 2001. Molecular indicators of genetic diversity in fish.

En línea: <http://www.epa.gov/nerleerd/gendiv.htm>

Elliot, N. Allozyme and mitochondrial DNA análisis of the tropical saddle-tail Sea Perch, *Lutjanus malabaricus* (Schneider), from Australian waters. Mar. Freshwater Res. 47: 869-876 pp.

Elliot, N., Smolenski, R. y Ward, R. 1994. Allozyme and mitochondrial DNA variation in orange roughy, *Hoplostethus atlanticus* (Teleostei: Trachichthyidae): little differentiation between Australian and North Atlantic populations. Marine Biology. 119: 621-627 pp

Ferguson, M. y Danzmann, R. 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55:1553-1563 pp.

Fletcher, W. y Summer, N. 1999. Spatial distribution of sardine (*Sardinops sagax*) eggs and larvae an application of geostatistics and resampling to survey data. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 907-914 pp.

Gaggiotti, O. y Marciano, R. 2001. Genetic variability in fish populations.

En línea: <http://www.sdsc.edu/GatherScatter/Gsummer96/gaggiotti.html>

Gharrett, A., Gray, A. y J. Heifetz. 2000. Identification of rockfish (*Sebastes* spp.) by restriction site analysis of the mitochondrial ND-3/ND-4 and 12S/16S rRNA gene regions. Fish. Bull. 99: 49-62 pp.

Grewe, P., Elliot, N. Innes, B. y Ward, R. 1997. Genetic population structure of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). Marine Biology. 127: 555-561 pp.

Hart, J.L., 1973. Pacific fishes of Canada.. Fish. Res. Board Can. Bull. 180. 740 p  
En:

<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.cfm?genusname=Sardinops&speciesname=sagax>

Hedgecock, D. (ed.) 1984. Identifying fish subpopulations. Proceedings of a California Sea Grant Workshop. Report No. T-CSGCP-013 SCRIPPS Institution of Oceanography University of California, San Diego. 1-50 pp.

Hedgecock, D., Hutchinson, E., Li, G., Sly, F. y Nelson, K. 1989. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine *Sardinops sagax caerulea*; comparison and contrast with historical data with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fish. Bull. 87:652-671 pp.

Hillis, D. y Dixon, M. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. 66:411-453 pp.

Hixon, J. y Brown, W. 1986. A comparison of the small ribosomal RNA genes from the mitochondrial DNA of the great apes and humans: sequence, structure, evolution and phylogenetic implications. Mol. Biol. Evol. 3: 1-18 pp.

Hsuan-Lin, W., Ruey-Shyang, H. y Liang-Ping, L. 2001. Identification of *Chlorella* spp. Isolates using ribosomal DNA sequences. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 115-121 pp.

Inoue, G., Miya, M., Tsukamoto, K. y M. Nishida. 2000. Complete mitochondrial DNA séquence of the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. Fisheries Science. 66:924-932 pp.

Jacobs, G. A., H. E. Hulbert, J. C. kindle, E. J. Metzger, J. L. Mitchel, W. J. Teague y A. J. Wallcraft. 1994. Decade-scale trans-Pacific propagation and warming effects of an El Niño anomaly. *Nature* 370:360-363. Citado en: Bowen, B y Grant, S. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops spp.*): assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones.

Jakobson, L. 2001. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) and northern anchovy (*Engraulis mordax*). Report of the first meeting of the SPACC/IOC Study Group on "Use of environmental indices in the managemet of pelagic fish populations" GLOBEC Special Contribution No. 5 (3-5 September 2001, Cape Town, South Africa).

Kazuo, T y Nobuhiko, T. 2000. Differences between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis. *Fisheries Science*. 66: 9-18 pp.

Kim, T., Crane, P., Spearman, W. y Seeb, L. 1998. DNA and allozyme markers provide concordant estimates of population differentiation: analyses of U.S. and Canadian populations of Yukon Riber fall-rum chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1748-1758 pp.

Kurtzman, C. y Robnett, Ch. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetus yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371 pp

Larson, A. y Wilson, A. 1989. Patterns of ribosomal RNA evolution in salamanders. *Mol. Biol. Evol.* 6: 131-154 pp.

Luna, S. 1999. Summary for *Sardinops sagax* larvae South American pilchard.

En línea:

[http://www.fishbase.org/larvalbase/Summary/LarvaSummary.cfm?genusname=Sardinops  
&speciesname=sagax](http://www.fishbase.org/larvalbase/Summary/LarvaSummary.cfm?genusname=Sardinops&speciesname=sagax)

Lluch-Belda, D., Schwartzlose, R.A., Serra, R., Parrish, R.H., Kawasaki, T., Hedgecock D., Crawford, R.J.M. (1992) Sardine and anchovy regime fluctuations of abundance in four regions of the world oceans: a workshop report. Fisheries Oceanography. 1(4): 339-347

Lluch-Belda, D. 1994. On the sources of recruitment variability in small pelagic fishes. North Pacific Marine Science Organization (PICES). Third Annual Meeting. Nemuro, Japón, 15-24 de octubre de 1994 (Conferencia).

Lluch-Cota, S. 2000. Propuesta de bases para un sistema de información ambiental para la pesquería de sardina del Golfo de California. Tesis Doctoral. CIBNOR 35 pp.

Matarese, A. y Sandknop, E. 1983. Identification of fish eggs. 27–30 pp. En: Moser, H. (Ed.). Ontogeny and Systematics of fishes. International Symposium, La Joya, California.

Matarese, A., Kendal, Al, Blood, D y Vinter, M. 1989. Laboratory guide to early life history stages of Northeast Pacific fishes. En línea:

<http://www.fishbase.org/photos/PicturesSummary.cfm?ID=1477&what=egg>

Mc Crae, J. 1994. Pacific Sardine *Sardinops sagax*. Oregon Dept. of Fish and Wildlife. En línea: <http://www.hmsc.orst.edu/odfw/devfish/sp/sard.html>

Meyer, A. 1994. DNA technology and phylogeny of fish. Capítulo 5. En: Beaumont, A. (ed.) Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman & Hall. London. 219-249 pp.

Miller, P y Mark, P. 1997. Tools For Populations Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A windows program fr the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software, distributed by author. En línea: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfpga.htm>

Mindell, D. y Honeycutt, R. 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic implications. Annu. Rev. Ecol. Sist. 21: 541-566 pp.

Okasaki, T. Kobayashi, T. y Uozumi, Y. 1996. Genetic relationships of pilchards (genus: *Sardinops*) with anti-tropical distributions. Mar. Biol. 126: 585-590 pp.

Olsen, G. y Woese, C. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. 7: 113-123 pp.

Orti, G., Petry, P., Porto, J. I., Jegu, M. y Meyer, A. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. J. Mol. Evol. 42: 169-182 pp.

Parrish, R., Serra, R. y Grant, W. 1989. The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*, their taxonomy, distribution stock structure and zoogeography. Can. J. Fish. Aquat Sciences 46:2019-2036 pp.

Pepin, P y Shears, T. 1997. Variability and capture efficiency of bongo and Tucker trawl samplers in the collection of ichthyoplankton and other macrozooplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54: 765-773pp.

Roemich, D., y J. McGowen. 1995. Climate warming and the decline of zooplankton in the California current *Science* 267:1324-1326. Citado en: Bowen, B y Grant, S. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops spp.*): assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones.

Smith, P. y Richardson, S. 1979. Técnicas modelo para prospecciones de huevos y larvas de peces pelágicos. FAO Documento Técnico No. 175. p. 1, 2, 26.

Stewart, G. W., A. M. Clark y B.W. Bowen. 1998. Why restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA failed to resolved sardine (*Sardinops*) biogeography: insights from mitochondrial DNA cytochrome b sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 2539-2547.

Schwartzlose, R.A., J. Alheit, A. Bakun, T. Baumgartner, R. Cloete, R. J. M. Crawford, W. J. Fletcher, Y. Green-Ruíz, E. Hagen, T. Kawasaki, D. Lluch-Belda, S. E. Lluch-Cota, A. D. MacCall, Y. Matsuura, M. O. Nevarez-Martinez, R. H. Parrish, C. Roy, R. Serra, K. V. Shust, N. M. Ward and J. Z. Zuzunaga. 1999. Worldwide large-scale fluctuations of sardine and anchovy populations. *Southafrican Journal of Marine Sciences.* 21: 289-347

UVIDOC, Version 97.04 para Windows 95. UVI Tech. St. Jones Innovation Center. Cambridge, U.K.

Vawter, L, y Brown, W. 1993. Rates and patterns of base change in the small subunit ribosomal RNA gene. *Genetics* 134: 597-608 pp.

Vrooman, M. 1964. Serologically differentiated subpopulations of the Pacific sardine, *Sardinops caerulea*. *Jour. Fish. Res. Canada.* 21 (4) 691-701 pp.

Walsh, S., Metzger, A. e Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a Medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. Vol. 10 No. 4:506-513 pp.

Warbrg, O. y Christian, W. 1941. Isolierung and kristallisation des garungsferments enolase. *Biochemestry* 310: 340p.

Ward, R. y Elliot, N. 2001. Genetic population structure of species in the South East fishery of Australia. *Mar. Freshwater Res.* 52: 563-573 pp.

Ward, R., Eliot, N., Grewe, P., Last, P. Innes, B y Yearsley, G. 1998. Allozyme and mitochondrial DNA variation in three species of oreos (Teleostei: Oreostomatidae) from Australian waters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. Vol. 32: 233-245 pp.

Wheeler, W. y Honeycutt, R. 1988. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 5: 90-96pp.

Whitehaed, P.J.P. 1985. Clupeoid fishes of the world. *FAO species catalogue*. Vol 7. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolf-herrings. Part 1 –Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. *FAO Fish Synop.*, (125) Vol. 7, Pt. 1:303 p.

Whitehead, P. y Rodríguez-Sánchez, R. 1994. Peces Óseos, Familia Clupeidae En: Karpenter, K. (ed.) *Hojas de identificación FAO para propósitos pesqueros, Pacífico Central Oriental*. 1008-1018 pp.

Whitmore, D. H. 1990. Electrophoretic and Isoelectric focusing techniques in fishery management. Cap. 3 Isoelectric focusing of proteins. *CRC Press* 82, 96, 97, 98 p.

Yogesh, S. y Milind, P. 2000. Sequense analysis of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene fragment from seven mosquito species. J. Biosci. 25 (4) 361- 366 pp.