

Nota de Investigación/Research Note

Diferencias en los genes *16SrRNA* y citocromo c oxidasa subunidad I de las lisas *Mugil cephalus* y *Mugil curema* y los robalos *Centropomus viridis* y *Centropomus robalito*

Differences in the *16SrRNA* and cytochrome c oxidase subunit I genes in the mullets *Mugil cephalus* and *Mugil curema*, and snooks *Centropomus viridis* and *Centropomus robalito*

AB Peregrino-Uriarte¹, R Pacheco-Aguilar², A Varela-Romero^{1,3}, G Yepiz-Plascencia^{1*}

¹ Laboratorios de Biología Molecular de Organismos Acuáticos y ² Productos Pesqueros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, PO Box 1735, Hermosillo CP 83000, México. *E-mail: gyepiz@cascabel.ciad.mx

³ DICTUS, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Hermosillo CP 83000, Sonora.

Resumen

Se estudiaron los genes mitocondriales codificantes del *16SrRNA* y citocromo c oxidasa, subunidad I (*COI*), de cuatro especies de peces comercialmente importantes del Golfo de California. Los peces incluyen dos lisas y dos robalos: la lisa rayada *Mugil cephalus* y la lisa blanca *Mugil curema*; y el robalo plateado *Centropomus viridis* y el robalo aleta amarilla *Centropomus robalito*. Los fragmentos de los genes *16SrRNA* y *COI* fueron obtenidos mediante amplificación por PCR. Las digestiones de restricción de los amplicones resultaron en patrones de bandeado diferentes entre las cuatro especies. Las distancias genéticas obtenidas con base en la secuencia del *16SrRNA* fue menor que con *COI* para ambos grupos de especies. La inferencia filogenética para ambos genes muestra monofilia para las cuatro especies en dos diferentes grupos, uno para las lisas y otro para los robalos. La monofilia de estos grupos fue evidente a pesar de las politomías con el resto de las especies incluidas en los análisis de remuestreo para máxima parsimonia y máxima verosimilitud.

Palabras clave: peces, genes mitocondriales, *16SrRNA*, *COI*, patrones de restricción

Abstract

The mitochondrial genes coding for *16SrRNA* and cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) in four commercially important fish species from the Gulf of California were studied. These fish species were the striped mullet *Mugil cephalus* and white mullet *Mugil curema*, and the white snook *Centropomus viridis* and yellowfin snook *Centropomus robalito*. Fragments of the *16SrRNA* and *COI* genes were obtained by PCR amplification. Restriction digest of the amplicons for both genes revealed different banding patterns among the four species. The genetic distance based on the *16SrRNA* gene sequence was smaller than for *COI* for both groups of species. Phylogenetic inference for both genes showed monophyly of the four species in two separate groups, one comprising the mullets and the other the snooks. Monophyly of the groups was observed despite the polytomies with the rest of the species included in the bootstrap analysis of maximum parsimony and maximum likelihood analyses.

Key words: fish, mitochondrial genes, *16SrRNA*, *COI*, restriction pattern.

Introducción

El Golfo de California es muy rico en especies de peces de importancia ecológica y comercial (Thomson *et al.* 2000). Las lisas y los robalos son especies abundantes en esta área, incluyendo al menos tres especies de lisas y cinco de robalos (Fischer *et al.* 1995, Rivas 1986). La adecuada identificación de especies de peces a partir de tejido fresco o filetes es una tarea difícil pero necesaria para la autenticación de productos procesados (Ram *et al.* 1996, Murgia *et al.* 2002), para la identificación de especies tóxicas (Ishizaki *et al.* 2005) y para el seguimiento de linajes genéticos (Tringali *et al.* 1996, Ravago-Gotanco y Juinio-Menez 2004), entre otras aplicaciones.

Actualmente, los estudios genéticos y moleculares de las especies nativas de peces en México son limitados,

Introduction

The Gulf of California is very rich in fish species of ecological and commercial importance (Thomson *et al.* 2000). Mulletts and snooks occur in abundance, and at least three species of the former and five of the latter are found in the area (Rivas 1986, Fischer *et al.* 1995). Identification of fish species from fresh tissue or fillets may be cumbersome; however, their proper identification is necessary to authenticate fishery products (Ram *et al.* 1996, Murgia *et al.* 2002), identify toxic species (Ishizaki *et al.* 2005) and follow genetic stocks (Tringali and Bert 1996, Ravago-Gotanco and Juinio-Menez 2004), among other applications.

Currently, genetic and molecular studies on native fishes from Mexico are limited, contrasting with the high diversity

contrastando con la gran diversidad y número de especies de peces del Golfo de California. Lisas y robalos son recursos pesqueros importantes y comprenden el 1.3 % de la producción nacional (SAGARPA 2003). Además, los robalos *Centropomus undecimalis* y *C. parallelus* ya están siendo cultivados (Zarza-Meza *et al.* 2006). Un proyecto inicial que describe las especies de peces del Golfo de California, incluyendo algunas lisas y robalos, comparó patrones de proteínas, lípidos y PCR-RFLP (disponible en <http://www.ciad.mx/catalogo/index.htm>). De este proyecto se seleccionaron dos especies de lisas y dos de robalos para analizar y comparar las secuencias de dos genes mitocondriales. Los genes mitocondriales han sido muy útiles para estudiar muchas especies de peces tales como atunes (Ram *et al.* 1996, Chow *et al.* 2000), lenguado (Céspedes *et al.* 1998, Sotelo *et al.* 2001), esturión, salmón y atún (Horstkotte y Rehbein 2003), sardina (De Donato *et al.* 2005), entre otros ejemplos. Además, los genes mitocondriales han sido ampliamente estudiados en algunos peces y varios genomas mitocondriales de peces han sido completamente secuenciados (Miya *et al.* 2001; Clements *et al.* 2003, Miya *et al.* 2003). Ya que la mayoría de los genes mitocondriales son altamente conservados, se han propuesto iniciadores llamados universales (Kocher *et al.* 1989) para el estudio de especies para las que todavía no se dispone de información.

Los peces incluidos en este trabajo fueron la lisa rayada *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), la lisa blanca *Mugil curema* (Cuvier y Valenciennes, 1836), el robalo plateado *Centropomus viridis* (Lockington, 1877) y el robalito o robalo aleta amarilla *Centropomus robalito* (Jordan y Gilbert, 1882). Estos peces fueron seleccionados para investigar variaciones en los genes mitocondriales *16SrRNA* y de la citocromo c oxidasa subunidad I (*COI*) entre las especies de cada género y para contrastar la conservación de los genes entre los dos géneros.

Materiales y métodos

Muestras y extracción de DNA total

Los especímenes de lisas *M. cephalus* (Mce) y *M. curema* (Mcu), y robalos *C. viridis* (Cvi) y *C. robalito* (Cro) fueron obtenidos de las pesquerías comerciales en Mazatlán, Sinaloa, en la costa este del Golfo de California en el Noroeste de México. Inmediatamente fueron colocados en hielo y transportados al laboratorio. La identificación de especies se basó en los criterios morfológicos de Jordan y Gilbert (1882), Walford (1937), Rivas (1986), Allen y Robertson (1994) y Fischer *et al.* (1995).

Los peces fueron fileteados y almacenados a -80 °C hasta su análisis. Se utilizaron cinco especímenes de cada especie para obtener individualmente el DNA genómico total de acuerdo con el método de Aljanabi y Martínez (1997), con las siguientes modificaciones. Aproximadamente 100–150 mg de músculo fueron homogeneizados en 500 µL de NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, a pH 8.0, por 30–60 s y se incubaron 15 min a 55°C. Después se añadió RNasa A (concentración final de 60 µg mL⁻¹), se incubó 1 h a 37°C, seguido

and number of fish species in the Gulf of California. Mulletts and snooks are important fishery resources in Mexico, corresponding to 1.3% of the national production (SAGARPA 2003). Furthermore, the snooks *Centropomus undecimalis* and *C. parallelus* are successfully being cultured (Zarza-Meza *et al.* 2006). An initial project was undertaken (available at <http://www.ciad.mx/catalogo/index.htm>) describing fish species from the Gulf of California, including some mulletts and snooks, and comparing protein, lipid and restriction patterns of polymerase chain reaction (PCR) fragments. In this study we selected two species of mulletts and two of snooks to analyze two mitochondrial genes. Mitochondrial genes have been useful to study many fish species, such as tuna and bonito (Ram *et al.* 1996); flatfish (Céspedes *et al.* 1998, Sotelo *et al.* 2001); tuna (Chow *et al.* 2000); sturgeon, salmon and tuna (Horstkotte and Rehbein 2003); sardine (De Donato *et al.* 2005), among others. Moreover, mitochondrial genes have been well studied in some fishes and several fish mitochondrial genomes are now completely sequenced (Miya *et al.* 2001, Clements *et al.* 2003, Miya *et al.* 2003). Since conservation of most mitochondrial genes is very high, conserved primers (Kocher *et al.* 1989) have been proposed for the study of species for which information is still unavailable.

The fishes analyzed in our study were the striped mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758), the white mullet *Mugil curema* (Cuvier and Valenciennes 1836), the white snook *Centropomus viridis* (Lockington 1877) and the yellowfin snook *Centropomus robalito* (Jordan and Gilbert 1882). These fishes were selected to compare variations in the mitochondrial genes *16SrRNA* and cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) among the species of each genus and to contrast gene conservation in both genera.

Material and methods

Samples and total DNA extraction

Specimens of *M. cephalus*, *M. curema*, *C. viridis* and *C. robalito* were obtained from commercial fisheries in Mazatlán, Sinaloa (Mexico), located on the east coast of the Gulf of California. They were immediately placed on a bed of ice and transported to the laboratory. Species identification was based on morphological criteria described by Jordan and Gilbert (1882), Walford (1937), Rivas (1986), Allen and Robertson (1994) and Fischer *et al.* (1995).

The fishes were filleted and stored at -80°C until processing. Five specimens of each species were selected to prepare individual total genomic DNA that was isolated according to Aljanabi and Martínez (1997), modified as follows. Approximately 100–150 mg of muscle were homogenized in 500 µL of 0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0, for 30–60 s and incubated 15 min at 55°C. Then, RNase A was added (final concentration of 60 µg mL⁻¹), incubated 1 h at 37°C, followed by addition of proteinase K (400 µg mL⁻¹) and SDS (2%), and incubated for 1 h at 60°C. The homogenate

por la adición de proteinasa K (400 µg mL⁻¹) y SDS (2%) y se incubó por 1 h a 60°C. El homogenizado fue centrifugado a 10,000 g, por 10 min, a 4°C. Para precipitar polisacáridos y proteínas se añadió 1/3 de volumen de NaCl 6 M, CTAB 1%, se incubó 1 h a 55°C, luego se extrajo dos veces con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la fase acuosa superior que contenía el DNA se colocó en otro tubo y se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol, 1 h a -20°C y centrifugado a 10,000 g, por 40 min, a 4°C. El DNA precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, fue secado por vacío y resuspendido en 50–100 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Patrones de restricción de los amplicones y secuenciación

Para estudiar los genes *16SrRNA* y *COI* de las especies antes mencionadas, se obtuvieron mediante amplificación por PCR dos fragmentos de ~1.3Kb para cada gen. Para el diseño de los iniciadores para la PCR, se alinearon las secuencias completas conocidas de los genomas mitocondriales de cuatro especies de peces, *M. cephalus* (NC_003182), *Scyliorhinus canicula* (NC_001950), *Danio rerio* (NC_002333) y *Engraulis japonicus* (NC_003097). Los primers usados para obtener los amplicones por PCR fueron: 16SF1, 5'-CCCTCACCTTTKGCATCATGA-3'; 16SR1, 5'-CGGTCTGAACTAGATCACGTA-3'; COIF1, 5'-AYCACAAGACATCGGCACCCT-3'; y COIR1, 5'-GGGTAGTCAGAYTATCGTCGAGG-3'. Los primers T7 y M13R fueron usados para secuenciar los fragmentos clonados. Los primers internos 16SF2, 5'-YCGTTAMYCCCACTGGMGTG-3'; 16SR2, 5'-RCACKCCAGTGTGGRKTAACG-3'; COIF2, 5'-TTCTGATTCTTTGGYCACCCAG-3' y COIR1 también fueron usados para secuenciar.

Los fragmentos de DNA se obtuvieron por amplificación por PCR a partir del DNA genómico total (300 ng) en 50 µL de una mezcla de reacción conteniendo MgCl₂ 3.0 mM, dNTP 50 µM de cada uno, 0.5 µM de cada primer y 1 unidad de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) en buffer de PCR (KCl 50 mM, Triton X-100 al 0.1%, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-200 DNA Engine (MJ Research, Waltham, MA), en las siguientes condiciones: para el fragmento del *16SrRNA*, 94°C por 3 min, seguidos de un ciclo de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min, y luego 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min (34 ciclos) y, finalmente, una extensión a 72°C por 10 min. Para el fragmento de *COI*, 94°C por 3 min; un ciclo de 60°C por 1 min, 72°C por 2 min, 94°C por 3 min, 52°C por 1 min, 72°C por 2 min (un ciclo), 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min (33 ciclos) y finalmente, una extensión por 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.0% y teñidos con bromuro de etidio (Sambrook *et al.* 1989).

Los amplicones de cinco especímenes independientes de cada especie fueron precipitados con isopropanol (Sambrook y Russell 2001), resuspendidos en agua y digeridos por separado con las enzimas *Hinf*I y *Msp*I, a 37°C por 4–5 h. Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles

was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. To precipitate polysaccharides and proteins, 1/3 volume of 6 M NaCl, 1% CTAB was added, incubated 1 h at 55°C, and then extracted twice with chloroform-isoamyl alcohol (24:1); the aqueous upper phase containing the DNA was placed in another tube and precipitated by adding one volume of isopropanol, kept 1 h at -20°C and centrifuged at 10,000 g for 40 min at 4°C. The DNA pellet was washed twice with 70% ethanol, vacuum dried and resuspended in 50–100 µL of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Restriction patterns of amplicons and sequencing

To study the *16SrRNA* and *COI* genes in the four species selected, two fragments of approximately 1.3 Kb of each gene were obtained by PCR amplification. To design the primers necessary for the PCR, the sequences of four known complete fish mitochondrial genomes, *M. cephalus* (NC_003182), *Scyliorhinus canicula* (NC_001950), *Danio rerio* (NC_002333), and *Engraulis japonicus* (NC_003097), were aligned and the highly conserved regions chosen. The primers used were: 16SF1, 5'-CCCTCGTACCTTTKGCATCATGA-3'; 16SR1, 5'-CGGTCTGAACTAGATCACGTA-3'; COIF1, 5'-AYCACAAGACATCGGCACCCT-3'; and COIR1, 5'-GGGTAGTCAGAYTATCGTCGAGG-3'. The primers T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) and M13R (AGGAAACGC-TATGACCATG) were used for sequencing cloned fragments. Internal primers 16SF2, 5'-YCGTTAMYCCCACTGGMGTG-3'; 16SR2, 5'-RCACKCCAGTGTGGRKTAACG-3'; COIF2, 5'-TTCTGATTCTTTGGYCACCCAG-3'; and COIR1 were also used for sequencing.

Total genomic DNA (300 ng) was used for PCR amplification in a 50 µL reaction mixture containing 3.0 mM MgCl₂, 50 µM each dNTP, 0.5 µM of each primer, and one unit of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen) in PCR buffer (50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3). Amplifications were carried out using a PTC-200 DNA Engine (MJ Research, Waltham, MA) as follows: for the *16SrRNA* fragment, 94°C for 3 min, 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min (one cycle); 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C for 2 min (34 cycles); and finally, an extension for 10 min at 72°C. For the *COI* fragment, 94°C for 3 min, 60°C for 1 min, 72°C for 2 min (one cycle); 94°C for 3 min, 52°C for 1 min, 72°C for 2 min (one cycle); 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min (33 cycles); and finally, an extension for 10 min at 72°C. The PCR products of ~1.3 Kb were analyzed in 1.0% agarose gels and stained with ethidium bromide (Sambrook *et al.* 1989).

The amplicons from five independent specimens of each species were precipitated with isopropanol (Sambrook and Russell 2001), resuspended in water and digested separately with the enzymes *Hinf*I and *Msp*I at 37°C for 4–5 h, and then analyzed by electrophoresis in 12% native polyacrylamide gels (Miniprotean II, BioRad) and stained with ethidium bromide. *Hinf*I and *Msp*I were selected for the digestions based on the

nativos de poliacrilamida al 12% (MiniProtean II, BIORAD) y teñidos con bromuro de etidio. Se seleccionaron las enzimas *Hinf*I y *Msp*I para la digestión con base en su presencia en los genes homólogos de otros peces. Las imágenes de los geles y los tamaños de los fragmentos fueron obtenidos y analizados usando el programa computacional Digital Science 1D (Kodak, Rochester, NY).

Los amplicones del *16SrRNA* de todas las especies y los de *COI* de las lisas, fueron clonados en el vector pCR2.1 TOPO TA y el DNA plasmídico fue purificado (Sambrook y Russell 2001) usando columnas GFX (Amersham Biotech). Los amplicones de *COI* de los robalos fueron secuenciados directamente sin ser clonados. Dado que el patrón de restricciones para los cinco especímenes de cada especie era idéntico, sólo se determinó la secuencia de nucleótidos para un espécimen de cada una. Todas las reacciones de secuenciación se realizaron en la Universidad de Arizona (Genomic Analysis and Technology Core).

Comparación de secuencias

Las secuencias nucleotídicas fueron editadas y alineadas usando los programas Editseq y Megalign (DNASTar, Madison, WI) y fueron comparadas usando el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Las secuencias de aminoácidos de *COI* fueron deducidas usando el código genético mitocondrial de vertebrados. El análisis de las distancias genéticas fue obtenido con el modelo F84 (Felsenstein, 2004). Se utilizó el programa PAUP* vers. 4.01b para búsquedas heurísticas con el criterio de máxima parsimonia con 100 réplicas aleatorias y bisección y reconexión de árboles. Se usó remuestreo (*bootstrapping*, de 1000 réplicas) para evaluar el soporte de los clados para el árbol de mayor parsimonia. Los análisis de máxima verosimilitud se realizaron con los modelos de evolución nucleotídica de cada gen, K81uf+I+G para *COI* y GTR+I+G para *16SrRNA*, estimados con el programa MODELTEST 3.0 (Posada y Crandall, 1998) con remuestreo de 100 réplicas. Se seleccionaron secuencias homólogas para uno o ambos genes de especies filogenéticamente cercanas empezando desde las especies y hasta el nivel de orden, usando la información disponible en el GenBank para las inferencias filogenéticas de acuerdo a la clasificación sistemática de Eschmeyer (1998). Para los robalos (orden Perciformes, suborden Percoidei) se usó *Lates calcarifer* NC_007439 (familia Centropomidae), *Micropterus salmoides* NC_008106, *Elassoma evergladei* NC_003175, (familia Centrarchidae), *Etheostoma radiosum* NC_005254, (familia Percidae), *Emmelichthys struhsakeri* NC_004407 (familia Emmelichthyidae), *Pagrus major* NC_003196 (familia Sparidae), *Pterocaesio tile* NC_004408 (familia Lutjanidae). Para las lisas (orden Perciformes, suborden Mugiloidei) *M. cephalus* NC_003182 y *Crenimugil crenilabis* NC_003170 (familia Mugilidae). Los otros subordenes dentro del orden Perciformes estuvieron representados por *Oreochromis mossambicus* NC_007231 (suborden Labroidei, familia Cichlidae), *Pholis crassispina* NC_004410 (suborden

presence of their sites in other homologous fish genes. Gel images and size of the fragments were obtained and analyzed using Digital Science 1D software (Kodak, Rochester, NY).

Amplicons of *16SrRNA* from all the species and amplicons of *COI* from mullets were cloned into the pCR2.1 TOPO TA vector and the plasmid DNA was purified (Sambrook and Russell 2001) using GFX spin columns (Amersham Biotech). The amplicons of *COI* from the snooks were sequenced directly without cloning. Since the restriction pattern for the five specimens of each species was identical, only one specimen for every species was used for nucleotide sequence determination. All the sequencing reactions were done at the Genomic Analysis and Technology Core of the University of Arizona.

Sequence comparisons

The nucleotide sequences were edited and aligned using the Editseq and Megalign programs (DNASTar, Madison, WI) and compared using Clustal W (Thompson *et al.* 1994). The amino acid sequence of *COI* was deduced using the vertebrate mitochondrial genetic code. Genetic distance analyses were obtained with the F84 model (Felsenstein 2004). PAUP* vers. 4.01b was used for maximum parsimony searches with heuristic approach, with 100 random addition replicates and tree-bisection-reconstruction swapping. Bootstrapping (1000 replicates) was used to assess relative support for clades on the most-parsimonious tree. Maximum-likelihood analyses were conducted under the K81uf+I+G (for *COI*) and GTR+I+G (for *16SrRNA*) models of nucleotide evolution for each gene estimated in the program Modeltest 3.0 (Posada and Crandall 1998), and run with bootstrapping of 100 replicates. Homologous sequences for one or both genes from closely related species and beginning from species to order level, available in GenBank, were used for the phylogenetic inference according to the systematic classification of Eschmeyer (1998). For snooks (order Perciformes, suborder Percoidei), we used *Lates calcarifer* NC_007439 (family Centropomidae), *Micropterus salmoides* NC_008106 and *Elassoma evergladei* NC_003175 (family Centrarchidae), *Etheostoma radiosum* NC_005254 (family Percidae), *Emmelichthys struhsakeri* NC_004407 (family Emmelichthyidae), *Pagrus major* NC_003196 (family Sparidae), and *Pterocaesio tile* NC_004408 (family Lutjanidae). For mullets (order Perciformes, suborder Mugiloidei), we used *Mugil cephalus* NC_003182 and *Crenimugil crenilabis* NC_003170 (family Mugilidae). The rest of the suborders within the order Perciformes were represented by *Oreochromis mossambicus* NC_007231 (suborder Labroidei, family Cichlidae), *Pholis crassispina* NC_004410 (suborder Zoarcoidei, family Pholidae), *Petrosirtes breviceps* NC_004411 (suborder Blennioidei, family Blenniidae), *Acanthogobius hasta* NC_006131 (suborder Gobioidi, family Gobiidae), and *Ariomma lurida* AB205431 (suborder Stromateoidei, family Nomeidae). As sister orders of Perciformes we used *Paralichthys olivaceus* NC_002386 (Pleuronectiformes),

Zoarcoidei, familia Pholidae), *Petroscirtes breviceps* NC_004411 (suborden Blennioidei, familia Blenniidae), *Acanthogobius hasta* NC_006131 (suborden Gobioidi, familia Gobiidae) y *Ariomma lurida* AB205431 (suborden Stroma-teoidei, familia Nomeidae). Como órdenes hermanos de perciformes se usaron *Paralichthys olivaceus* NC_002386 (Pleuronectiformes), *Cottus reinii* NC_004404, *Dactyloptena tiltoni* NC_004402 (Scorpaeniformes), *Gasterosteus aculeatus* NC_003174 (Gasterosteiformes), *Hypoatherina tsurugae* NC_004386 (Atheriniformes), *Arcos* sp. NC_004413 (Gobiesociformes) y *Takifugu rubripes* NC_004299 (Tetraodontiformes); y finalmente, *Oncorhynchus mykiss* DQ288271 (Salmoniformes) se usó como grupo externo. Los árboles construidos fueron generados usando el programa TreeViewX 0.5.0 (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx/>).

Resultados y discusión

Patrones de restricción para lisas y robalos

Los amplicones de DNA mitocondrial de ~1.3 Kb para los genes *16SrRNA* y *COI* fueron obtenidos individualmente de cinco especímenes de cada una de las cuatro especies estudiadas. En todos los casos, solo se detectó un amplicón, lo que indica que la amplificación fue gene-específica (fig 1). La digestión con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Msp* I produjeron exactamente el mismo patrón en los cinco

Cottus reinii NC_004404 and *Dactyloptena tiltoni* NC_004402 (Scorpaeniformes), *Gasterosteus aculeatus* NC_003174 (Gasterosteiformes), *Hypoatherina tsurugae* NC_004386 (Atheriniformes), *Arcos* sp. NC_004413 (Gobiesociformes), *Takifugu rubripes* NC_004299 (Tetraodontiformes), and finally, *Oncorhynchus mykiss* DQ288271 (Salmoniformes) was used as outgroup. The trees constructed were generated using TreeViewX 0.5.0 (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx/>).

Results and discussion

Restriction patterns for mullets and snooks

Mitochondrial DNA amplicons of ~1.3 Kb for the *16SrRNA* and *COI* genes separately, were obtained from five specimens of each of the four species studied. Only one amplicon was detected in every case, indicating gene-specific amplification (fig. 1). Digestion with the restriction enzymes *Hinf* I and *Msp* I produced exactly the same pattern per species in five individuals; however, the banding pattern was different among the four species (fig. 1). Digestion of the *16SrRNA* DNA amplicon from *M. cephalus* with *Hinf*I resulted in two clearly distinguished fragments of 565 and 675 bp, while for *M. curema* the digestion resulted in a fragment of 953 bp and three smaller fragments that were very faint in the gel due to their small size (fig. 1a). Restriction patterns of *16SrRNA* with

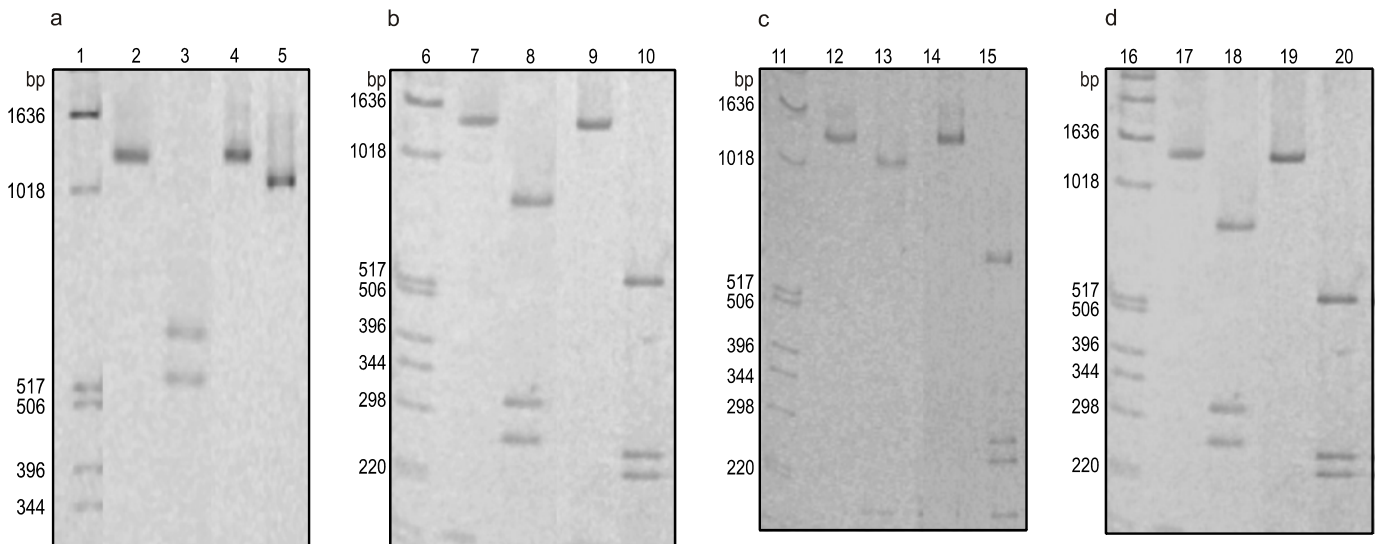


Figura 1. Patrones de restricción de los amplicones *16SrRNA* digeridos con *Hinf*I o *Msp*I. (a) Carriles 2 y 3, *Mugil cephalus*; carriles 4 y 5, *Mugil curema*; carriles 3 y 5, amplicones digeridos con *Hinf*I; carriles 2 y 4, DNA sin digerir. (b) Carriles 7 y 8, *Centropomus viridis*; carriles 9 y 10, *Centropomus robalito*; carriles 8 y 10, DNA digerido con *Hinf*I; y carriles 7 y 9, DNA sin digerir. (c) Carriles 12 y 13, *M. cephalus*; carriles 14 y 15, *M. curema*; carriles 3 y 5, DNA digerido con *Msp*I y carriles 12 y 14, DNA sin digerir. Panel D: carriles 17 y 18, *C. viridis*; carriles 19 y 20, *C. robalito*; carriles 18 y 20, DNA digerido con *Msp*I y carriles 7 y 9, DNA sin digerir. Carriles 1, 6, 11 y 16, 1 Kb DNA Ladder.

Figure 1. Restriction banding patterns of the *16SrRNA* amplicons digested with *Hinf*I or *Msp*I. (a) Lanes 2 and 3, *Mugil cephalus*; lanes 4 and 5, *Mugil curema*; lanes 3 and 5, *Hinf*I digested amplicons; and lanes 2 and 4, not digested DNA. (b) Lanes 7 and 8, *Centropomus viridis*; lanes 9 and 10, *Centropomus robalito*; lanes 8 and 10, *Hinf*I digested DNA; and lanes 7 and 9, not digested DNA. (c) Lanes 12 and 13, *Mugil cephalus*; lanes 14 and 15, *Mugil curema*; lanes 13 and 15, *Msp*I digested DNA; and lanes 12 and 14, not digested DNA. (d) Lanes 17 and 18, *Centropomus viridis*; lanes 19 and 20, *Centropomus robalito*; lanes 18 and 20, *Msp*I digested amplicons; and lanes 17 and 19, not digested DNA. Lanes 1, 6, 11 and 16, 1 Kb DNA Ladder.

Tabla 1. Matriz de distancias genéticas* obtenidas por el modelo F84 de Felsenstein (2004) de los genes *16SrRNA* (abajo) y *COI* (arriba).
Table 1. Genetic distance* matrix by the F84 model of Felsenstein (2004) of the *16SrRNA* (below) and *COI* (above) gene sequence.

	1	2	3	4	5
1 <i>Mugil cephalus</i>		0.158	0.259	0.256	0.246
2 <i>Mugil curema</i>	0.112		0.235	0.263	0.254
3 <i>Centropomus viridis</i>	0.259	0.264		0.201	0.261
4 <i>Centropomus robalito</i>	0.287	0.276	0.127		0.271
5 <i>Onchorhynchus mykiss</i>	0.263	0.265	0.274	0.289	

* Gamma correction 0.5

individuos por especie; sin embargo, los patrones de bandeo fueron diferentes entre las cuatro especies (fig 1). La digestión del amplicón *16SrRNA* de *M. cephalus* con *Hinf*I produjo dos fragmentos claramente diferentes de 565 y 675 pb, mientras que para *M. curema* se obtuvo un fragmento de 953 pb y 3 fragmentos más pequeños que fueron muy tenues en el gel debido a su tamaño (fig. 1a). Los patrones de restricción del *16SrRNA* con *Hinf*I de los robalos presentan 3 bandas para cada especie, pero todas de tamaño diferente: 812, 284 y 236 pb para *C. viridis*, y 542, 227 y 200 pb para *C. robalito* (fig. 1b). Los patrones de bandeo obtenidos con *Msp*I también fueron apropiados para distinguir las cuatro especies estudiadas (fig. 1c, d). Por otro lado, los patrones de bandeo de los amplicones de *COI* fueron especie-específicos con ambas enzimas de restricción (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con reportes de patrones de bandeo diferentes obtenidos de fragmentos de genes mitocondriales de peces (Céspedes *et al.* 1999) e identificación de especies de ostiones, a pesar del alto grado de conservación de las secuencias mitocondriales (Klinbunga *et al.* 2003).

Comparación de secuencias nucleotídicas de lisas y robalos

Para obtener información adicional sobre las diferencias genéticas entre las cuatro especies, se determinaron completamente las secuencias nucleotídicas de ambas cadenas de los amplicones obtenidos de un individuo de cada especie. Las longitudes de los amplicones *16SrRNA* fueron muy similares: 1362 y 1334 pb para *M. cephalus* y *M. curema*, respectivamente; y 1377 y 1368 pb para *C. viridis* y *C. robalito*, respectivamente. Las secuencias de los primers fueron excluidas de las secuencias de los amplicones *16SrRNA* y fueron depositadas en el GenBank con los siguientes números de acceso: *M. cephalus*, **DQ307686**; *M. curema*, **DQ307687**; *C. robalito*, **DQ307688**; y *C. viridis*, **DQ307689**.

El análisis de las secuencias nucleotídicas reveló que la distancia genética entre las lisas, basada en el gen *16SrRNA* fue 0.112, mientras que para los robalos fue 0.127. Las distancias más grandes (casi el doble del valor) se encontraron al comparar lisas y robalos (tabla 1). Debido a que el *16SrRNA* es uno de los genes más altamente conservados (Stepien y Kocher 1997), quisimos obtener más información para las comparaciones. Para esto, se secuenció completamente en

*Hinf*I from the snooks have three bands for each species but all of different size: 812, 284 and 236 bp for *C. viridis*, and 542, 227 and 200 bp for *C. robalito* (fig. 1b). The fragment patterns obtained with *Msp*I were also different among the four species studied (fig. 1c, d). Likewise, the banding pattern from the *COI* amplicons was different among the species with both restriction enzymes (data not shown). These results agree with reports about the different banding pattern of fragments of mitochondrial genes for fish (Céspedes *et al.* 1999) and oyster species identification, albeit the high conservation of the mitochondrial sequences (Klinbunga *et al.* 2003).

Comparison of nucleotide sequences from mullets and snooks

To obtain further insights about the gene differences in these four species, the nucleotide sequences of both strands of the *16SrRNA* amplicons were completely determined from one individual of each species. The lengths of the *16SrRNA* amplicons were very similar: 1362 and 1334 bp for *M. cephalus* and *M. curema*, respectively, and 1377 and 1368 bp for *C. viridis* and *C. robalito*, respectively. The primer sequences were excluded from the sequencing data and the *16SrRNA* sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: *M. cephalus*, **DQ307686**; *M. curema*, **DQ307687**; *C. robalito*, **DQ307688**; and *C. viridis*, **DQ307689**.

Analysis of the nucleotide sequence revealed that the genetic distance between the mullets based on the *16SrRNA* gene was 0.112, while for the snooks, it was 0.127. The distances were larger (almost doubling the value), when mullets and snooks were compared (table 1). Since *16SrRNA* is one of the most highly conserved genes (Stepien and Kocher 1997), we wanted to obtain more information for comparisons. Therefore, a 582-bp fragment (internal in the original amplicon, towards the 3'-end) of the *COI* gene was also completely sequenced in both strands. For *COI*, the genetic distance was 0.158 between the mullets and 0.201 between the snooks; as before, these values were larger when the mullets were compared with the snooks (table 1). Thus, the conservation of *16SrRNA* is greater than that of *COI*, and it is more notorious when the mullets and snooks are compared using the *COI* gene. These values correlate to the higher variation in protein

ambas cadenas un fragmento de 582 pb (interno en el amplicón original, hacia el extremo 3') del gen *COI*. Para el gen *COI*, la distancia genética fue de 0.158 para las lisas y 0.201 para los robalos; como antes, estos valores fueron mayores cuando se comparan lisas y robalos (tabla 1). Así, la conservación del *16S rRNA* es mayor que la de *COI* y es más notoria cuando se comparan las lisas con los robalos usando el gen *COI*. Estos valores correlacionan con la mayor variación permitida en

coding genes derived from the existence of synonymous codons and, therefore, the higher genetic distances obtained when using *COI* for the analysis.

For both mullets and snooks, even though the genetic distances were relatively small, the digests of the amplicon generated different digestion patterns. This is evident in the sequence alignments since there are regions with greater similarity than others, even among the species from the same

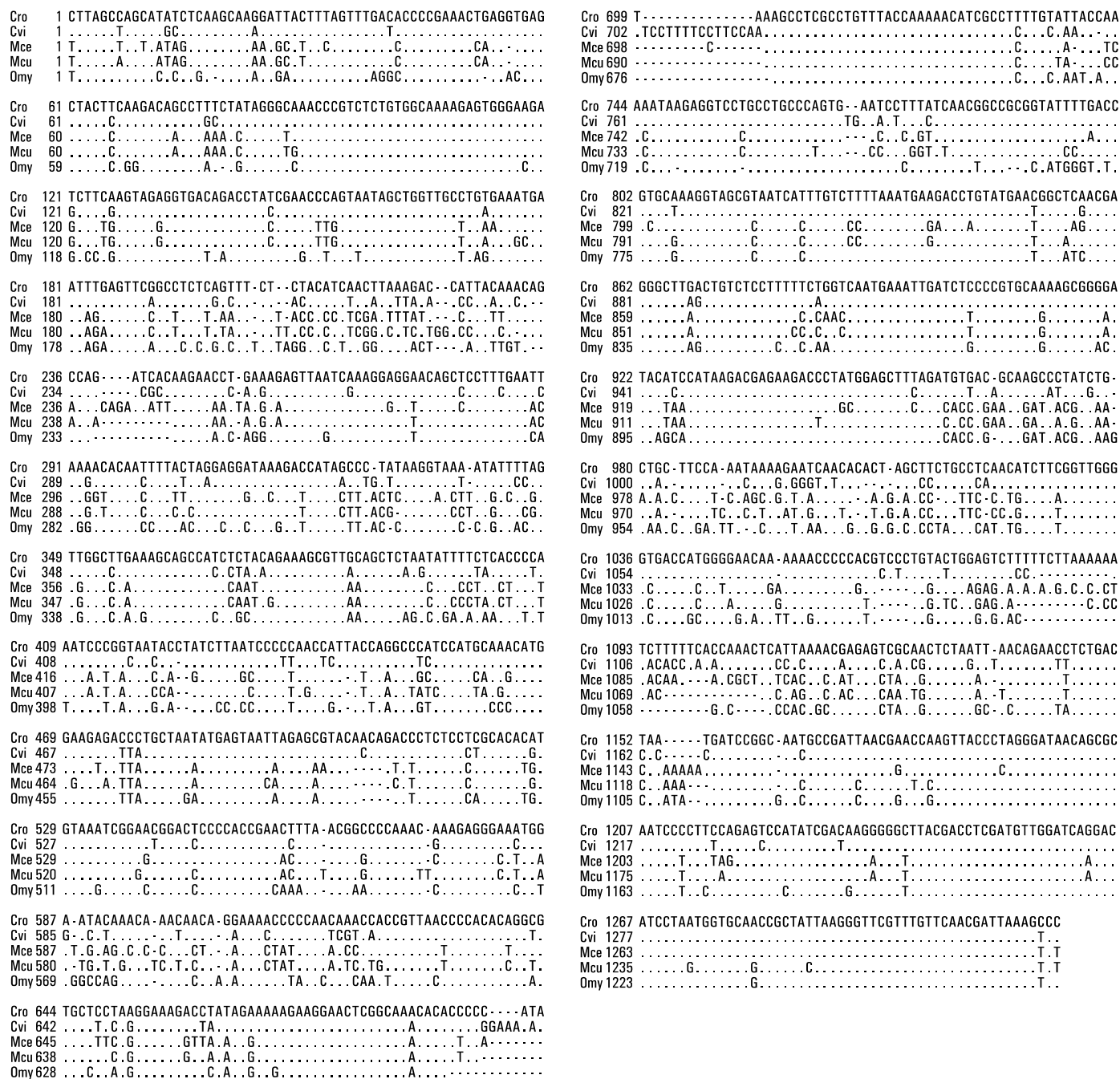


Figura 2. Alineación de las secuencias nucleotídicas del fragmento del *16SrRNA* usando Clustal W. Lisas *Mugil cephalus* (Mce) y *M. curema* (Mcu), robalos *Centropomus viridis* (Cvi), *C. robalito* (Cro) y trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Omy), incluida para la comparación como una especie de pez distante.

Figure 2. Nucleotide sequence alignment of the *16SrRNA* fragment using Clustal W. Mulletts *Mugil cephalus* (Mce) and *M. curema* (Mcu), snooks *Centropomus viridis* (Cvi) and *C. robalito* (Cro), and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Omy) included for comparison as a distant fish species.

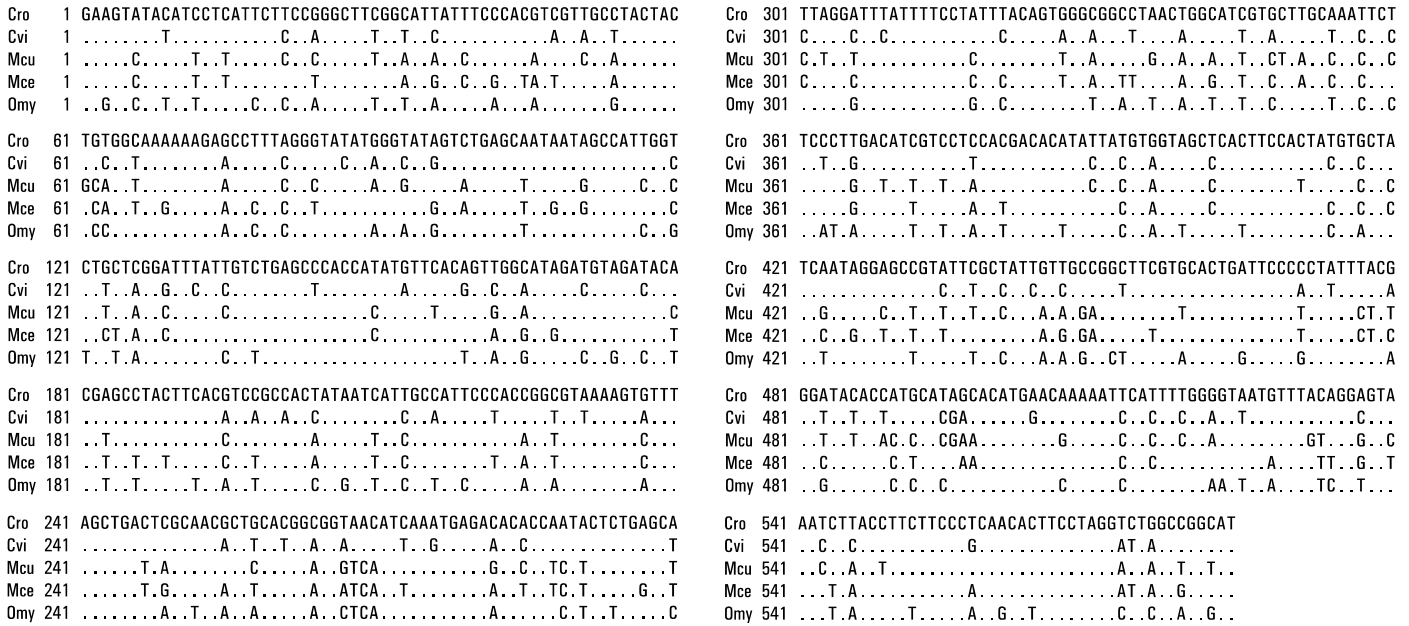


Figura 3. Alineación de las secuencias nucleotídicas del fragmento del *COI* usando Clustal W. Lisas *Mugil cephalus* (Mce) y *M. curema* (Mcu), robalos *Centropomus viridis* (Cvi) y *C. robalito* (Cro) y turcha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Omy), incluida para la comparación como una especie de pez distante.
Figure 3. Alignment of the *COI* nucleotide sequence fragments using Clustal W. Mulletts *Mugil cephalus* (Mce) and *M. curema* (Mcu), snooks *Centropomus viridis* (Cvi) and *C. robalito* (Cro), and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Omy) included for comparison as a distant fish species.

genes codificantes de proteínas por la existencia de codones sinónimos y, por esto, las distancias genéticas son mayores cuando se obtienen usando *COI* en el análisis.

Para ambos, lisas y robalos, aunque las distancias genéticas son relativamente pequeñas la digestión de los amplicones generó patrones diferentes. Esto es evidente en las alineaciones de las secuencias ya que hay regiones con mayor similitud que otras, aún entre las especies del mismo género, y las regiones más variables coinciden entre las cuatro especies (figs. 2, 3). Las variaciones en las secuencias genéticas entre diferentes poblaciones de estas especies de peces podrían revelar otros haplotipos en estudios posteriores. Las secuencias de *COI* fueron depositadas en el GenBank con los siguientes números de acceso: *M. cephalus*, **DQ309555**; *M. curema*, **DQ310722**; *C. robalito*, **DQ310723** y *C. viridis*, **DQ310724**.

Las diferencias entre los dos genes de las cuatro especies corresponden adecuadamente con las identidades de las secuencias y son consistentes con las relaciones filogenéticas de las especies analizadas de cada género (Tringali *et al.* 1999, Rocha-Olivares *et al.* 2000, Papatotiroopoulos *et al.* 2001, Rossi *et al.* 2004). Las inferencias heurísticas por parsimonia muestran monofilia para las cuatro especies en dos grupos separados, uno para *M. cephalus* y *M. curema* y otro para *C. viridis* y *C. robalito* para ambos genes (fig. 4). La monofilia de estos grupos se mantuvo a pesar de las politomías observadas con el resto de las especies incluidas en el análisis de remuestreo de máxima parsimonia (1000 réplicas) y máxima verosimilitud (100 réplicas). La inferencia filogenética limitada es evidente al usar los fragmentos de los genes para niveles taxonómicos mayores. Los órdenes de la clase

genus, and the more variable regions coincide among the four species (figs. 2, 3). Variations in gene sequence between different populations of these fish species in subsequent studies may reveal other haplotypes, but this remains to be investigated. The *COI* sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: *M. cephalus*, **DQ309555**; *M. curema*, **DQ310722**; *C. robalito*, **DQ310723**; and *C. viridis*, **DQ310724**.

The differences among the two genes from the four species correspond well with the sequence identities and are consistent with the taxonomic and phylogenetic relationships of the analyzed species for each genus (Tringali *et al.* 1999, Rocha-Olivares *et al.* 2000, Papatotiroopoulos *et al.* 2001, Rossi *et al.* 2004). Heuristic parsimony inference shows monophyly of the species of each genus in two separate groups, one comprising *M. cephalus* and *M. curema*, and the other comprising *C. viridis* and *C. robalito*, for both genes (fig. 4). Monophyly of each genus was observed despite the polytomies of the other species included of closely related species, genera, suborders and orders of the class Actinopterygii in the bootstrap analysis of maximum parsimony (1000 iterations) and maximum likelihood (100 iterations). Limited phylogenetic inference was evident in using these gene fragments for higher taxonomic levels. The orders of the class Actinopterygii, the suborders of Perciformes and some of the families were found mixed without a coherent phylogenetic signal. In contrast, the relationships observed for the species of each genus were consistent for both species of the genus *Mugil*, forming a clade with the rest of the Mugilidae, and even with the genus *Centropomus* of the subfamily Centropominae and genus *Lates*

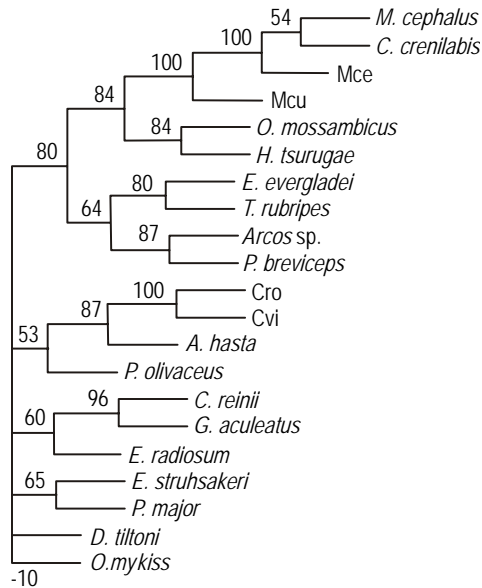


Figura 4. Topología del árbol obtenido por máxima verosimilitud de las secuencias nucleotídicas del *16SrRNA* (~1.3 Kb) de las lisas *Mugil cephalus* (Mce) y *M. curema* (Mcu) y los robalos *Centropomus viridis* (Cvi) y *C. robalito* (Cro) de este estudio. Los números sobre los nodos son los porcentajes de réplica no paramétrica.

Figure 4. Tree topology of the maximum likelihood search of *16SrRNA* (~1.3 Kb) nucleotide sequences for the mullets *Mugil cephalus* (Mce) and *M. curema* (Mcu), snooks *Centropomus viridis* (Cvi) and *C. robalito* (Cro) of this study. Numbers above the nodes are the nonparametric bootstrap percentages.

Actinopterygii, los subórdenes dentro de Perciformes y algunas de las familias aparecen mezcladas sin una señal filogenética coherente. En contraste, la relación para las especies de cada género fue consistente para las especies del género *Mugil*, formando un clado con el resto de Mugilidae y aún con el género *Centropomus* de la familia Centropominae y con *Lates* de la subfamilia Latinae, que forma un clado con la familia Centropomidae. Las relaciones filogenéticas obtenidas con *COI* fueron más limitadas para definir la monofilia, por lo que no se presentan. Finalmente, el estudio aquí reportado provee información sobre dos genes mitocondriales de cuatro especies de peces y muestra que aún cuando las especies son cercanas y los genes mitocondriales son bastante conservados, existe suficiente información para poder distinguir entre ellos.

Agradecimientos

Agradecemos a G García-Sánchez por el apoyo técnico, a AM van der Heiden y M Ruiz-Guerrero por la captura y la identificación de los peces completos y a R Sotelo-Mundo por la revisión del manuscrito. Se agradece el financiamiento a CONACYT (proyectos L0083-T y 34348-B).

Referencias

Allen GR, Robertson DR. 1994. Fishes of the Tropical Eastern Pacific. Univ. Hawaii Press, Honolulu, 322 pp.

of the subfamily Latinae, which clade forming the family Centropomidae. Phylogenetic relationships within *COI* were more limited for defining monophyly and are not presented. Finally, this paper provides information about two mitochondrial genes from four fish species and shows that even though the species are phylogenetically close and that the mitochondrial genes are generally highly conserved, the information obtained allows the differentiation of the four fishes.

Acknowledgements

We are grateful to G García-Sánchez for technical help, and to AM van der Heiden and M Ruiz-Guerrero for the capture and taxonomic identification of the fishes. Thanks also to R Sotelo-Mundo for critical reading of the manuscript. We acknowledge financial support from CONACYT (grants L0083-T and 34348-B).

Aljanabi SM, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692–3.

Céspedes A, Garcia T, Carrera E, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez PE, Martin, R. 1998. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a short fragment of the cytochrome b gene for identification of flatfish species. *J. Food Prot.* 61: 1684–1685.

Céspedes A, Garcia T, Carrera E, Gonzalez I, Fernandez A, Hernández PE, Martin R. 1999. Identification of sole (*Solea solea*) and greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1046–1050.

Chow S, Okamoto H, Miyabe N, Hiramatsu K, Barut N. 2000. Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Mol. Ecol.* 9: 221–227.

Clements KD, Gray RD, Choat JH. 2003. Rapid evolutionary divergences in reef fishes of the family Acanthuridae (Perciformes: Teleostei). *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 190–201.

De Donato M, de Loroño IM, Ramírez I, Marin B. 2005. Low genetic differentiation among sardine populations, *Sardinella aurita*, from eastern Venezuela. *Cienc. Mar.* 31: 529–535.

Eschmeyer WN. 1998. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences, San Francisco.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

Felsenstein J. 2004. PHYLIP version 3.63. Dept. of Genetics, University of Washington, Seattle.

Fischer W, Krupp F, Schneider W, Sommer C, Carpenter KE, Niem VH. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centrooriental. Vol III. Vertebrados. Parte 2. Roma.

Horstkotte B, Rehbein H. 2003. Fish species identification by means of restriction fragment polymorphism and high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 68: 2658–2666.

Ishizaki S, Yokoyama Y, Oshiro N, Teruya N, Nagashima Y, Shiomi K, Watanabe S. 2005. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. *Comp. Biochem. Physiol.* 1D: 139–144.

- Jordan DS, Gilbert CH. 1882. Description of five new species from Mazatlan, Mexico. Proc. US Natl. Mus. 4 [para: 1881] (254): 458–463.
- Klinbunga S, Khamnamtong N, Tassanakajon A, Puanglarp N, Jarayabhand P. 2003. Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. Mar Biotechnol. 5: 27–36.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6196–6200.
- Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. 2001. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. Mol. Biol. Evol. 18: 1993–2009.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishidab M. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: A new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 26: 121–138.
- Murgia R, Tola G, Archer SN, Vallerga S, Hirano J. 2002. Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: Application to identify the origin of processed ovary products (bottarga). Mar. Biotechnol. 4: 119–126.
- Papasotiropoulos V, Klossa-Kilia E, Kiliias G, Alahiotis S. 2001. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) using Allozyme data. Biochem. Genet. 39: 155–168.
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 1: 817–818.
- Ram JL, Ram ML, Baidoun FF. 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. J. Agric. Food Chem. 44: 2460–2467.
- Ravago-Gotanco RG, Juinio-Meñez MA. 2004. Population genetic structure of the milkfish, *Chanos chanos*, based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial control region. Mar. Biol. 145: 789–801.
- Rivas LR. 1986. Systematic review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. Copeia 1986(3): 579–611.
- Rocha-Olivares A, Garber NM, Stuck KC. 2000. High genetic diversity, large inter-oceanic divergence and historical demography of the striped mullet. J. Fish Biol. 57: 1134–1149.
- Rossi AR, Ungaro A, De Innocentiis S, Crosetti D, Sola L. 2004. Phylogenetic analysis of Mediterranean mugilids by allozymes and 16S mt-rRNA genes investigation: Are the Mediterranean species of *Liza* monophyletic? Biochem. Genet. 42: 301–314.
- SAGARPA. 2003. Anuario Estadístico de Pesca 2003. Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura., México DF, p. 256.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Sotelo CG, Calo-Mata P, Chapela MJ, Pérez-Martín RI, Rehbein H, Hold GL, Rusell VJ, Pryde S, Quintero J, Izquierdo M, Rey-Méndez M, Rosa C, Santos AT. 2001. Identification of flatfish (Pleuronectiformes) species using DNA-based techniques. J. Agric. Food Chem. 49: 4562–4569.
- Stepien CA, Kocher TD. 1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Kocher TD, Stepien CA (eds.), Molecular Systematics of fishes. Academic Press, San Diego, pp. 1–11.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Res. 22: 4673–4680.
- Thomson DA, Findley LT, Kerstitch AN. 2000. Reef Fishes of the Sea of Cortes: The Rocky-shore Fishes of the Gulf of California. Univ. Texas Press.
- Tringali MD, Bert TM. 1996. The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 974–984.
- Tringali MD, Bert TM, Seyoum S, Bermingham E, Bartolacci D. 1999. Molecular phylogenetics and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). Mol. Phylogenet. Evol. 13: 193–207.
- Walford LA. 1937. Marine Game Fishes of the Pacific Coast from Alaska to the Equator. Univ. California Press, Berkeley, 205 pp. [Reprint with corrections, TFH Publ. & Smithsonian Inst. Press, 1974.]
- Zarza-Meza EA, Berruecos-Villalobos JM, Vázquez-Peláez C, Alvarez-Torres P. 2006. Experimental culture of snook *Centropomus undecimalis* and chucumite *Centropomus parallelus* (Perciformes: Centropomidae) in artisanal ponds. Cienc. Mar. 32: 219–227.

Recibido en agosto de 2006;
aceptado en enero de 2007.