



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO
Eugerres JORDAN Y EVERMANN, 1927
(TELEOSTEI: GERREIDAE)

TESIS

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

PRESENTA

MARÍA ISABEL MIRANDA MARÍN

LA PAZ, B. C. S., JUNIO DE 2014



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

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

"FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Eugerres* Jordan y Evermann, 1927 (TELEOSTEI: GERREIDAE)"

Presentada por el alumno:

MIRANDA

Apellido paterno

MARÍN

materno

MARÍA ISABEL

nombre(s)

Con registro:

A	1	2	0	3	6	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DR. ADNAN FELIPE GONZÁLEZ ACOSTA
Director de Tesis

DRA. BERTHA PATRICIA ESCALANTE PLIEGO
2ª. Directora de Tesis

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

M.C. GUSTAVO DE LA CRUZ AGÜERO

DRA. MARÍA DEL ROCÍO RODILES HERNÁNDEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 26 del mes Mayo del año 2014
el (la) que suscribe BM. MARÍA ISABEL MIRANDA MARÍN alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A120369 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. ADRIÁN FELIPE GONZÁLEZ ACOSTA Y DRA. BERTHA PATRICIA ESCALANTE PLIEGO
y cede los derechos del trabajo titulado:

"FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Eugerres* Jordan y Evermann, 1927 (TELEOSTEI: GERREIDAE)"

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

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: i73 3@hotmail.com - aacosta@ipn.mx - tilmatura@ib.unam.mx

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

BM. MARÍA ISABEL MIRANDA MARÍN

nombre y firma

DEDICATORIA

A mi familia por darme siempre todo su cariño y apoyo. A Leonardo, a todos los amigos de La Paz y a la familia Luna Vázquez quienes a lo largo de este tiempo se han convertido también en mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A las becas otorgadas por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) a través de los proyectos SIP 20121115, 20131620 y 20141337; a la beca Tesis por parte del Instituto Politécnico Nacional y el apoyo otorgado para la asistencia a congresos internacionales por parte de la Subdirección Académica y de Investigación del IPN-CICIMAR.

A mis directores de tesis Dr. Adrián Felipe González Acosta (CICIMAR-IPN) y Dra. Patricia Escalante Pliego (IB-UNAM) por sus consejos y paciencia en el desarrollo de este proyecto.

A mi comité asesor, Dra. Rocío Rodiles Hernández (ECOSUR-SC) por su apoyo dentro de los muestreos en los estados de Chiapas y Tabasco, así como al Dr. David Alfaro Siqueiros Beltrones (CICIMAR-IPN), M. en C. Gustavo De la Cruz Agüero (CICIMAR-IPN) y Dr. José Luis Ortíz Galindo (CICIMAR-IPN), por sus consejos y las correcciones realizadas durante el desarrollo y revisión de esta tesis.

A los integrantes de la Colección Nacional de Peces y de Aves del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México por su valioso apoyo.

A B.M. Mariana Díaz Santana Iturríos y B.M. María Moreno Alcántara por su apoyo en la traducción del resumen.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	IV
GLOSARIO.....	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	7
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
Obtención de muestras biológicas.....	14
Extracción de ADN, amplificación conducida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.....	15
Análisis de datos.....	17
Análisis de Máxima Parsimonia	18
Asignación de un modelo explícito de sustitución.....	18
Análisis de Máxima Verosimilitud	19
Análisis Bayesiano.....	20
Cálculo de distancias genéticas.....	21
RESULTADOS	22
Análisis de Máxima Parsimonia	22
Análisis de Máxima Verosimilitud	25
Análisis de Inferencia Bayesiana	29

Cálculo de distancias genéticas.....	32
Análisis filogenéticos sin incluir al componente dulceacuícola (<i>E. castroaguirrei</i> + <i>E. mexicanus</i>) como parte del género <i>Eugerres</i>	36
Análisis de Máxima Parsimonia (sin incluir al componente dulceacuícola del género <i>Eugerres</i>).....	36
Análisis de Máxima Verosimilitud (sin incluir al componente dulceacuícola del género <i>Eugerres</i>).....	38
Análisis de Inferencia Bayesiana (sin incluir al componente dulceacuícola del género <i>Eugerres</i>).....	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES.....	49
LITERATURA CITADA	50
ANEXOS	58
Anexo 1. Datos de identificación, recolecta y colección de depósito de los ejemplares recolectados (<i>Diapterus brevirostris</i> , <i>Eugerres awlae</i> , <i>Eugerres axillaris</i> , <i>Eugerres castroaguirrei</i> , <i>Eugerres lineatus</i> , <i>Eugerres mexicanus</i> , <i>Eugerres plumieri</i> y <i>Gerres cinereus</i>) y de aquellos depositados en el Sistema de Códigos de Barras de la Vida (<i>Eugerres brasiliensis</i> y <i>Eucinostomus currani</i>).....	58
Anexo 2. Procedimiento seguido para la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo	66
Anexo 3. Protocolo del Centro Canadiense para la Amplificación del Código de Barras de la Vida (citocromo c oxidasa subunidad 1), desarrollado por Ivanova y Graninger (2006).	68
Anexo 4. Número de secuencias genéticas obtenidas a partir de un fragmento de genoma mitocondrial (COI), analizadas por especie del género <i>Eugerres</i> y grupos externos. Entre paréntesis, el acrónimo de la especie usado en todos los análisis.	71
Anexo 5. Matriz de las secuencias genéticas (COI) utilizadas para generar los cladogramas a partir de los métodos de Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Grupo interno, integrado por las especies que componen al género *Eugerres*. (A) *E. awlae*, (B) *E. axillaris*, (C) *E. brasilianus*, (D) *E. brevimanus*, (E) *E. castroaguirrei*, (F) *E. lineatus*, (G) *E. mexicanus* y (H) *E. plumieri*. 6
- Figura 2. Especies asignadas como grupo externo dentro del análisis filogenético desarrollado. (A) *Diapterus brevirostris*, (B) *Gerres cinereus* y (C) *Eucinostomus currani*. 14
- Figura 3. Cladograma de consenso derivado del análisis de Parsimonia. Los números en las ramas indican el soporte de cada nodo (basado en el índice de “bootstrap” con 10 000 repeticiones). 23
- Figura 4. Cladograma de consenso simplificado, derivado del análisis de Parsimonia. Los números sobre las ramas indican el soporte de cada nodo (índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones). 24
- Figura 5. Cladograma derivado del análisis de Máxima Verosimilitud. Valor de máxima verosimilitud Ln -1883. Los números sobre las ramas indican el soporte de estas (índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones). El tamaño de los triángulos presentados en las ramas terminales indica el grado de variabilidad intraespecífica. 27
- Figura 6. Cladograma obtenido a partir de un análisis de Inferencia Bayesiana. Los números sobre cada rama representan el valor de probabilidad posterior (valores cercanos a 1 representan el 100% de certidumbre en la hipótesis planteada), mientras que el tamaño de los triángulos presentados en las ramas terminales indica el grado de variabilidad intraespecífica. 30
- Figura 7. Dendrograma basado en el método del vecino más cercano (NJ), obtenido a partir del cálculo de la divergencia nucleotídica de las secuencias de citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), para especies del género *Eugerres* y grupos hermanos. La estimación fue realizada a partir de la elección de un modelo de transiciones con distribución gama (TIM2+G). 32
- Figura 8. Hipótesis filogenética derivada del análisis de Parsimonia, sin incluir al componente dulceacuícola del género *Eugerres* (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*).

Los números sobre las ramas indican su soporte a partir del índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones. 37

Figura 9. Hipótesis filogenética derivada del análisis de Máxima Verosimilitud, sin incluir al componente dulceacuícola del género (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*). Los números sobre las ramas indican su soporte a partir del índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones. 39

Figura 10. Hipótesis filogenética derivada del análisis de Inferencia Bayesiana, sin incluir al componente dulceacuícola del género (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*). Los números sobre cada rama representan el valor de probabilidad posterior..... 41

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Números de acceso de las secuencias obtenidas en sitio web del Centro Canadiense para la Amplificación del Código de Barras de la Vida BOLD-Systems (http://www.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records) 17

Tabla II. Distancias genéticas estimadas para las especies del género *Eugerres* y especies fraternas, mediante el método del vecino más cercano (NJ) y utilizando un modelo de sustitución de transiciones con distribución gama (TIM2+G). Los números en negritas indican los menores, mayores y nulos porcentajes de diferenciación genética..... 34

Tabla III. Porcentajes de diferenciación genética estimados a partir del cálculo de la divergencia nucleotídica de las secuencias de citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), para los componentes con distribución dulceacuícola y marino-estuarino de *Eugerres* spp. y grupos externos. Estimación realizada mediante la elección de un modelo de transiciones con distribución gama (TIM2+G). 35

GLOSARIO

ADN mitocondrial. Material genético que existe en las mitocondrias.

Carácter. Es una propiedad del organismo. Cualquier atributo (morfológico, molecular, etológico, ecológico, biogeográfico, etc.) que podamos observar en un organismo.

Carácter apomórfico. Es aquel que surge a partir del carácter plesiomórfico, es decir, que resulta de una transformación del carácter dentro del grupo de estudio.

Carácter plesiomórfico. Es aquel que surge primero en el tiempo, ya que se halla o se infiere que se hallaba en el antecesor del grupo de estudio.

Cladismo. Constituye un método empleado para descubrir y describir patrones naturales de tipo histórico que exhiben descendencia con modificación.

Cladograma. Diagrama que representa las relaciones entre las especies de acuerdo a sinapomorfías, resultado de un análisis cladístico.

COI. Citocromo c oxidasa subunidad 1. Segmento de ADN mitocondrial de los vertebrados conformado por aproximadamente 1545 pares de bases. Una región con aproximadamente 650 pares de bases nitrogenadas que comienza cerca del inicio de la fase de lectura *cox*, es nominada la región del código de barras.

Estado del carácter. Diferentes alternativas de un carácter.

Filogenia. Historia del desarrollo evolutivo de los organismos.

Grupo externo. Es una especie o un taxón utilizado en análisis filogenéticos para evaluar presumibles homologías que indican relaciones genealógicas dentro del grupo de estudio y en el cual hay caracteres primitivos. El grupo externo es utilizado para rotar el árbol y determinar la polaridad de los caracteres.

Grupo hermano. Una especie o un grupo monofilético que está genealógicamente cercano a otra especie o a otro grupo monofilético.

Grupo interno. Es el grupo que es analizado por el investigador.

Grupo monofilético. También conocido como clados o grupos naturales. Son aquellos que incluyen todos los descendientes de un ancestro común. Pueden ser reconocidos por compartir una o más sinapomorfías o por poseer una combinación particular de caracteres.

Grupo parafilético. También conocidos como grados. Es un grupo en el que uno o más de los descendientes del ancestro en común no están incluidos dentro del grupo. Se forman con base en plesiomorfías.

Grupo polifilético. Son aquellos que incluyen descendientes de ancestros distintos y se forman con base en paralelismos o convergencias.

Homoplasia. Es el caso en que un carácter se desarrolla independientemente a partir de ancestros diferentes. Según provengan de los mismos o diferentes caracteres, se consideran paralelismos o convergencias.

Inferencia Bayesiana. Método estadístico utilizado para inferir la probabilidad de que una hipótesis sea verdadera, con base en la evidencia disponible. Este método combina la probabilidad previa de una filogenia con el árbol de verosimilitud, para producir una probabilidad posterior en la distribución de los árboles. El mejor estimador de la filogenia puede ser seleccionado mediante el árbol con el mayor valor de probabilidad posterior (valor igual a 1).

Máxima Verosimilitud. Método estadístico utilizado para inferir filogenias a partir de estimados de la máxima probabilidad para obtener una muestra dada. En el caso de los análisis filogenéticos, se elige el árbol o hipótesis filogenética con la mayor probabilidad de ocurrir a partir de datos observados en un conjunto de caracteres discretos.

Morfometría. Todo lo relativo a medidas o dimensiones de la forma de un organismo; incluye proporciones del cuerpo o las relaciones en el tamaño de varias características morfológicas del organismo. También se define como el empleo de métodos numéricos para el análisis de la forma corporal de un organismo, en relación con su tamaño.

Nodos internos o componentes. Son los puntos de ramificación del cladograma, es decir, que están conectados con dos o más nodos o taxones terminales.

Parsimonia. Método para inferir un árbol evolutivo a partir de caracteres discretos (sinapomorfías), el cual supone que entre hipótesis alternativas hay que elegir la que requiera un menor número de homoplasias.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés. Técnica utilizada para amplificar (multiplicar) un fragmento de ADN.

Raíz o nodo basal. Es la base o punto de partida del cladograma.

Ramas internas o internodos. Son los segmentos que unen nodos internos.

Ramas terminales. Son los segmentos que unen nodos internos y taxones terminales.

Simplesiomorfía. Es un carácter plesiomórfico presente en dos o más taxa.

Sinaporfía. Es un carácter apomórfico compartido por dos o más taxones.

Sistemática filogenética. Es un enfoque de la sistemática y taxonomía que intenta reconstruir las relaciones evolutivas entre los taxa y dentro de una clasificación biológica formal que es consistente con dichas relaciones.

Taxa. Plural de taxón.

Taxón. Cualquier unidad taxonómica definible, por ejemplo: especie, tribu, género, familia.

Taxonomía. Teoría y práctica de describir, nombrar y ordenar grupos de organismos en términos de taxa. El ordenamiento está basado en un código de nomenclatura biológica y de acuerdo a sus relaciones en un esquema jerárquico.

Definiciones propuestas por:

- 1) Morrone J. J. 2000. *El lenguaje de la cladística*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 100p.
- 2) Wiley E.O. y B.S. Lieberman. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics, Second Edition*. Wiley-Blackwell. U.S.A. 406 pp.

RESUMEN

El género *Eugerres* Jordan y Evermann, 1927 está representado por tres especies con distribución en el Pacífico oriental tropical: *E. axillaris* (Günther, 1864), *E. brevimanus* (Günther, 1864) y *E. lineatus* (Humboldt, 1821); otras tres especies distribuidas en el Atlántico occidental tropical: *E. awlae* (Schultz, 1949), *E. brasilianus* (Cuvier, 1830) y *E. plumieri* (Cuvier, 1830); y dos más, de ambientes dulceacuícolas del sureste de México y norte de Guatemala: *E. mexicanus* (Steindachner, 1869) y *E. castroaguirrei* González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013. Estudios filogenéticos sustentados en el análisis morfológicos, han demostrado que el género *Eugerres* es un grupo monofilético; dicha hipótesis fue contrastada en el presente estudio, utilizando información de tipo molecular. Para ello, se analizaron 61 secuencias genéticas de un segmento de gen mitocondrial (citocromo c oxidasa subunidad 1, COI por sus siglas en inglés); siete de ellas obtenidas del Sistema de Código de Barras de la Vida (BOLD System) para las especies *E. brasilianus* y *Eucinostomus currani* Zahuranec, y 54 secuencias de ejemplares recolectados en campo que corresponden al resto de las especies que integran el grupo interno (*Eugerres* spp., con excepción de *E. brevimanus*) y dos grupos externos: *Diapterus brevirostris* (Ranzani, 1842) y *Gerres cinereus* Walbaum, 1792. Con esta información, se generó una matriz de secuencias alineadas que fue utilizada para llevar las reconstrucciones filogenéticas del género *Eugerres*, aplicando los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Las topologías de los árboles resultantes permitió determinar que el género *Eugerres* constituye un grupo parafilético-polifilético, en donde el componente dulceacuícola manifiesta un origen evolutivo independiente con relación al grupo de especies de *Eugerres* con distribución en ambientes marino-estuarinos. A su vez, éstas últimas podrían reflejar una relación antigua entre las cuencas del Atlántico occidental y Pacífico oriental.

Palabras clave: *Eugerres*, Sistemática Molecular, Parafilia, Polifilia, COI.

ABSTRACT

The genus *Eugerres* Jordan and Evermann, 1927 is represented by three species with distribution in the tropical eastern Pacific: *E. axillaris* (Günther, 1864), *E. brevimanus* (Günther, 1864), and *E. lineatus* (Humboldt, 1821). Other three species distributed in the tropical western Atlantic: *E. awlae* (Schultz, 1949), *E. brasilianus* (Cuvier, 1830), and *E. plumieri* (Cuvier, 1830), plus two species in freshwater ecosystems of the southeastern Mexico and northern Guatemala: *E. mexicanus* (Steindachner, 1869) and *E. castroaguirrei* González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013. Phylogenetic studies based on morphological characters have confirmed the monophyly of the genus *Eugerres*. The hypothesis on the monophyly of this genus was tested using molecular data. We analyzed 61 genetic sequences from the cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) of mitochondrial gene segment, seven of them obtained from the life data barcode system (BOLD system) for *E. brasilianus* and *Eucinostomus currani* Zahuranec, 1980. Other 54 sequences from collected specimens in field belonging to included to the ingroup (*Eugerres* spp., with exception *E. brevimanus*) and those from de outgroup *Diapterus brevimanus* (Ranzani, 1842) and *Gerres cinereus* Walbaum, 1792 were also sequenced. A matrix of data was employed for the phylogenetic reconstruction of the genus *Eugerres* by using Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, and Bayesian Inference methods. Based on the resulting topologies, we determined that the genus *Eugerres* is a paraphyletic-polyphyletic group, where the freshwater group showed an independent origin from the marine-estuarine *Eugerres* spp. The marine-estuarine species could reflect an ancient relationship between the eastern Pacific (*E. axillaris* and *E. lineatus*) and western Atlantic (*E. awlae*, *E. plumieri* and *E. brasilianus*) basins.

Key words: *Eugerres*, Molecular Systematic, Paraphyly, Polyphyly, COI.

INTRODUCCIÓN

La familia Gerreidae comprende un grupo de peces que en Latinoamérica son comúnmente conocidos como mojarra, malacapas o periches (Bussing, 1995; Castro-Aguirre *et al.*, 1999). Son organismos de cuerpo plateado uniforme o con bandas oscuras a los lados del cuerpo y de tamaño pequeño, aunque se ha reportado una longitud máxima de 47.5 mm LP para la mojarra trompetera *Gerres cinereus* (Rodríguez-Romero *et al.*, 2008). Estos peces se caracterizan por presentar una boca extremadamente protráctil, la aleta caudal furcada y una vaina escamosa que cubre la base de las aletas dorsal y anal (Bussing, 1995; Castro-Aguirre *et al.*, 1999; Gilmore y Greenfield, 2002; Nelson, 2006). La notable capacidad de osmorregulación de las especies representativas de la familia les permite habitar en ambientes de tipo mixohalino (lagunas costeras y estuarios), sobre fondos de arena y fango, en áreas cubiertas con vegetación de manglar y pastos marinos, así como incursionar de manera temporal en áreas cercanas a la desembocadura de ríos, o vivir permanentemente en ambientes dulceacuícolas (Castro-Aguirre, 1978; Castro-Aguirre *et al.*, 1994; González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013).

La familia Gerreidae está integrada por ocho géneros en los que se incluyen alrededor de 55 especies (Nelson, 2006; Eschmeyer y Fong, 2013). Cuatro de estos géneros muestran una distribución en ambas costas de América: *Diapterus* Ranzani, 1840; *Eucinostomus* Baird y Girard, 1855; *Eugerres* Jordan y Evermann, 1927 y *Gerres* Quoy y Gaimard, 1824. Asimismo, se considera que dentro de la clasificación taxonómica de los peces, la familia Gerreidae es un grupo basal del suborden Percoidei, el cual se caracteriza por ser el más diverso y generalizado de los 20 subórdenes del orden Perciformes (Nelson, 2006). En términos generales, los grupos basales del suborden Percoidei tienden a compartir una serie de caracteres morfológicos que dificultan su correcta identificación y la diferenciación taxonómica entre sus especies, lo que de cierto modo complica la comprensión de sus relaciones evolutivas (Johnson, 1980). Ejemplo de lo anterior es la familia Gerreidae, la cual a pesar de haber sido objeto de numerosos estudios que han coadyuvado a esclarecer el estatus taxonómico y delimitar las relaciones evolutivas de algunos de sus miembros

(v.gr., Ruíz-Carus y Uribe-Alcocer, 2003; Chen *et al.*, 2007; Burnes-Romo, 2009; Ortíz-Galindo, 2009; González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013), aún persisten confusiones y omisiones selectivas sobre la taxonomía y filogenia de algunos géneros que integran a la familia, tal como lo señalan diversos autores (González-Acosta, 2005; Álvarez-Pliego, 2009; Andreatta, 2011; Miranda-Marín, 2011; Chollet-Villapando, 2012 y Vergara-Solana, 2012).

En lo que se refiere a los estudios filogenéticos apoyados en el uso de la perspectiva molecular, se ha establecido que en muchos de los casos su aplicación ha permitido esclarecer las relaciones evolutivas que existen entre grupos con problemas taxonómicos diversos, mismos que se presentan ante la dificultad de poder clarificar o determinar la taxonomía alfa de algunas especies, debido a su similitud fenotípica (v.gr., Farias *et al.*, 2000; Ruíz-Carus y Uribe-Alcocer, 2003; Chen *et al.*, 2007; Roa-Varón y Ortí, 2009). Conflictos de este tipo son muy comunes entre los grupos basales del suborden Percoidei, tal como es el caso de las especies de la familia Gerreidae (Johnson, 1980; Nelson, 2006; Ortíz-Galindo, 2009).

De modo particular, las especies que componen al género *Eugerres* (Figura 1), se caracterizan por la presencia de serraciones en el margen inferior del preopérculo y preorbital (infraorbital 1 o lacrimal), características que en su conjunto las distinguen del resto de los géneros americanos. Por ejemplo, márgenes lisos o enteros (sin serraciones) en la serie opercular de *Eucinostomus* spp. y *Gerres* spp.; o bien, preopérculo serrado y preorbital liso en *Diapterus* spp. Los miembros de *Eugerres* presentan, además, una serie de líneas negras longitudinales en ambos lados del cuerpo (Castro-Aguirre *et al.*, 1999; González-Acosta *et al.*, 2005; González-Acosta *et al.*, 2007a) que están ausentes o menos definidas en el resto de los géneros anfiamericanos.

Dentro del género *Eugerres*, son reconocidas seis especies con distribución en ambientes estuarino-lagunares de la región del Atlántico occidental tropical: *Eugerres awlae* (Schultz, 1949), *Eugerres brasilianus* (Cuvier, 1830) y *Eugerres plumieri* (Cuvier, 1830); y de la región del Pacífico oriental tropical: *Eugerres axillaris* (Günther, 1864), *Eugerres brevimanus* (Günther, 1864) y *Eugerres lineatus* (Humboldt, 1821), además de otras especies cuya distribución es exclusiva de ambientes dulceacuícolas de la

vertiente de los ríos Grijalva-Usumacinta al norte de Guatemala y sureste de México: la mojarra mexicana o Pichincha, *Eugerres mexicanus* (Steindachner, 1869) y la recientemente descrita mojarra Lacandona, *Eugerres castroaguirrei* González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013 (González-Acosta *et al.*, 2005, 2007a; González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013).

Estudios filogenéticos sustentados en el análisis de caracteres de tipo morfológico, han demostrado que el género *Eugerres* es un grupo monofilético (González-Acosta, 2005); así también, la aplicación de la morfometría geométrica ha permitido realizar inferencias filogenéticas basadas en la similitud morfológica de las especies que integran este grupo de peces (Miranda-Marín, 2011; Miranda-Marín y González-Acosta, 2012), a partir de las cuales se establece una clara diferenciación morfológica entre el componente dulceacuícola y el componente marino estuarino de *Eugerres*, la cual, podría ser producto de los distintos ambientes de distribución, o bien, de un origen evolutivo independiente entre ambos grupos. Dichas hipótesis pueden corroborarse mediante la aplicación de técnicas de tipo molecular, razón por la que con el presente estudio se pretende llevar a cabo la reconstrucción de la filogenia del género *Eugerres*, utilizando información generada a través del análisis de marcadores moleculares. De esta forma se podrán contrastar las hipótesis sobre la monofilia del género *Eugerres*, la posición taxonómica del componente dulceacuícola dentro del género, así como la validez taxonómica de las especies que lo integran.

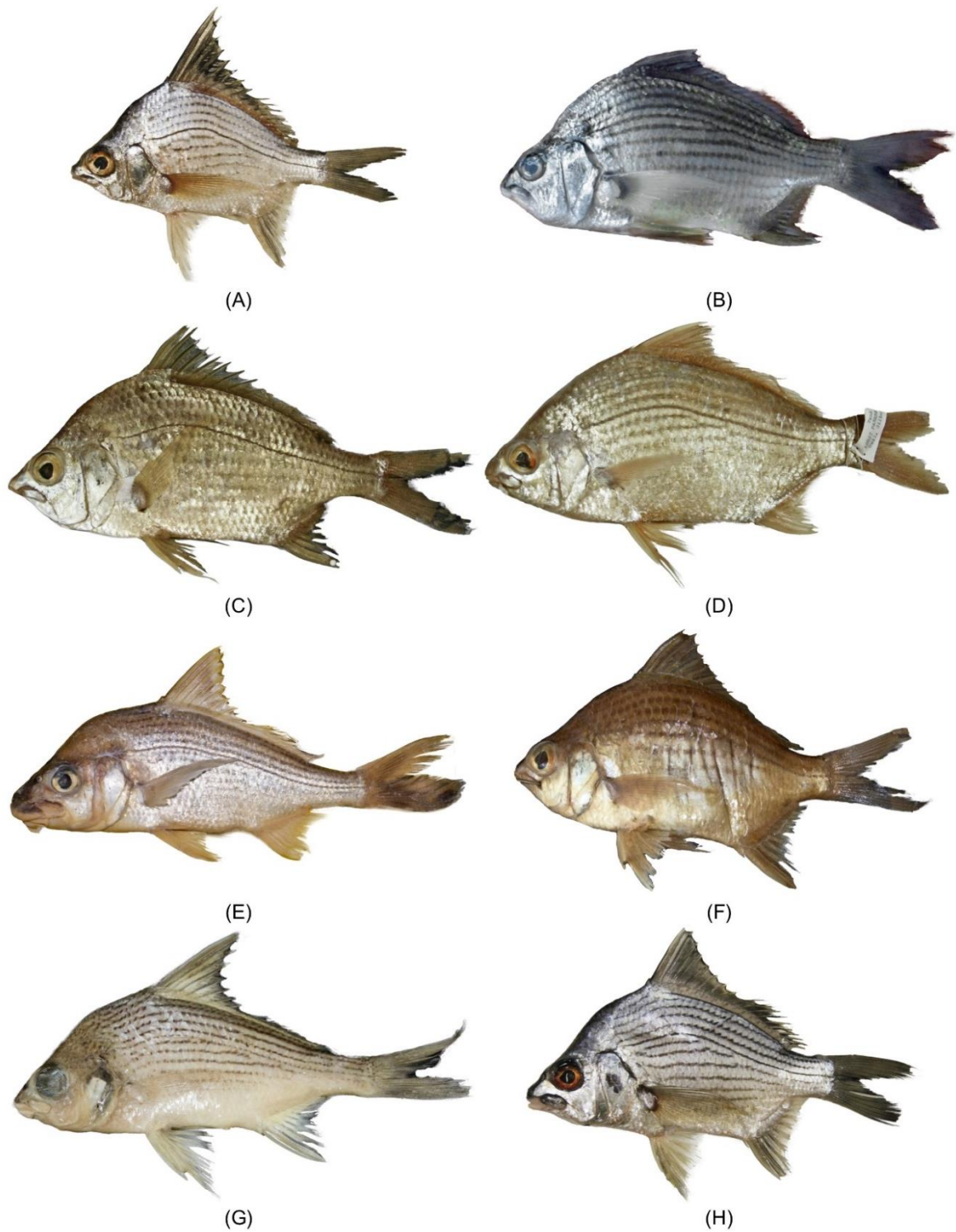


Figura 1. Grupo interno, integrado por las especies que componen al género *Eugerres*. (A) *E. awlae*, (B) *E. axillaris*, (C) *E. brasilianus*, (D) *E. brevimanus*, (E) *E. castroaguirrei*, (F) *E. lineatus*, (G) *E. mexicanus* y (H) *E. plumieri*.

ANTECEDENTES

A más de siglo y medio de su descripción, son numerosos los trabajos que se tienen acerca de la familia Gerreidae, algunos de los cuales abordan aspectos generales de su biología y ecología trófica (Cyrus y Blaber, 1983; Aguirre-León y Yáñez-Arancibia, 1984; Abou-Seedo, 1993; Araujo y De Alcántara-Santos, 1999; Rivas *et al.*, 1999; Aguirre-León y Díaz-Ruiz, 2000; De la Cruz-Agüero *et al.*, 2011; Valdez-Zenil *et al.*, 2014); además de otros de tipo taxonómico (Curran, 1942; Matheson y McEachran, 1984; Pérez-Hernández y Zavala-Hurtado, 1993; González-Acosta *et al.*, 2005, 2007 a, b; Burnes-Romo, 2009) y estudios sustentados en análisis de tipo morfométrico (De la Cruz-Agüero y Galván, 1993; Chollet-Villalpando, 2012), osteológico (Lemos *et al.*, 1992; Álvarez-Pliego, 2004; Kobelkowsky, 2004), genético (Benítez-Cortés, 2004; Chen *et al.*, 2007; Vergara-Solana, 2012), filogenético y biogeográfico (De la Cruz-Agüero, 2001; González-Acosta, 2005; Álvarez-Pliego, 2009) que han permitido conocer y entender las posibles relaciones evolutivas entre algunos miembros de la familia.

El primer estudio conocido que intenta dilucidar las relaciones evolutivas de todos los géneros que integran a la familia Gerreidae, fue realizado por Ortíz-Galindo (2009), quien basó su trabajo en un análisis de tipo cladista a partir de caracteres morfológicos de individuos en períodos iniciales de vida (embrión, larva y juvenil) y adultos. Dicho autor determinó que la familia constituye un grupo monofilético y estableció que los conjuntos genéricos: *Diapterus-Eugerres* y *Gerres-Eucinostomus*, son géneros hermanos.

De modo particular, también se han realizado diversos estudios filogenéticos de algunos géneros selectos de gerréidos, con el propósito de resolver su compleja taxonomía y establecer hipótesis sobre su historia evolutiva. En los siguientes párrafos se hace mención de los trabajos realizados en los últimos 13 años, los cuales pueden ser consultados en caso de interesarse en abundar más con relación a los grupos taxonómicos tratados para cada estudio.

El género *Eucinostomus* Bair y Girard, 1855, fue revisado por De la Cruz-Agüero (2001) siguiendo criterios basados en datos morfométricos y en la osteología del

esqueleto caudal; a partir de esto, estableció la monofilia del género y la validez de ocho especies. También se mencionó la posibilidad de considerar a *Gerres* como género hermano de *Eucinostomus*.

Gerres (Walbaum, 1792), un género monotípico en América, fue estudiado en su taxonomía por Burnes-Romo (2009); quien entre sus conclusiones propuso la hipótesis de reconocer a *Gerres cinereus* (Walbaum, 1792) como especie válida para la región del Atlántico occidental tropical y a *Gerres similimus* Regan, 1907 como la correspondiente para la región del Pacífico oriental tropical.

La especies *Diapterus* Ranzani, 1842, fueron estudiadas por Álvarez-Pliego (2009), mediante el empleo de caracteres morfológicos y la aplicación de un análisis de tipo cladista, a partir del cual demostró la monofilia del género y confirmó a *Eugerres* como grupo hermano de *Diapterus*. En contraste y por medio de un estudio que combinó el empleo de caracteres morfométricos y moleculares, Vergara-Solana (2012) estableció que *Diapterus* es un grupo polifilético; dicho autor además sugiere “excluir” a la especie *D. aureolus* como parte del género en cuestión con el fin de determinar a *Diapterus* como un grupo monofilético. La diferenciación taxonómica de *D. aureolus* con respecto al género *Diapterus* había sido establecida en las revisiones del género por parte de Deckert (1973), Deckert y Greenfield (1987) y Álvarez-Pliego (2009), aunque a la fecha no existe ningún trabajo publicado donde se le dé formalidad a esta idea.

Entre los estudios que se han realizado sobre el género de interés está el de González-Acosta (2005), quien por medio de un análisis cladístico sustentado en el análisis de caracteres morfológicos (merísticos, morfométricos y osteológicos), estableció al género *Eugerres* como un grupo monofilético y reconoció la validez taxonómica de siete especies de *Eugerres*: tres con distribución en la vertiente del Atlántico occidental, tres en el Pacífico oriental y una confinada en ambientes dulceacuícolas de la Región Neotropical. Como resultado de lo anterior, González-Acosta *et al.* (2005) y González-Acosta *et al.* (2007a) publicaron formalmente la revisión taxonómica y sistemática del género, donde corroboran lo antes señalado. Recientemente, González-Acosta y Rodiles-Hernández (2013) establecieron con base en la revisión taxonómica del componente dulceacuícola del género *Eugerres*, la

validez taxonómica de *Eugerres mexicanus* y la descripción de una nueva especie de Gerreidae denominada *Eugerres castroaguirrei*, en honor al Dr. José Luis Castro Aguirre, ampliando de este modo el número de especies dulceacuícolas dentro de esta familia de peces. Estudios recientes realizados por medio de la aplicación de la herramienta de análisis de morfometría geométrica, Miranda-Marín (2011) y Miranda Marín y González-Acosta (2012), demuestran que la similitud morfológica entre las especies que integran a *Eugerres* está estrechamente relacionada con su historia evolutiva y que la notable diferenciación morfológica del componente dulceacuícola con relación al componente marino-estuarino de *Eugerres*, podría ser producto de su distinto ambiente distribución, o bien, del origen evolutivo independiente de ambos componentes.

El empleo de técnicas moleculares dentro de la sistemática de grupos ícticos, como la que se aplica en el presente estudio, puede ser de gran utilidad cuando se trata de esclarecer relaciones evolutivas entre grupos con diversos problemas taxonómicos (*v.gr.* Farias *et al.*, 2000; Ruiz-Carus y Uribe-Alcocer, 2003; Chen *et al.*, 2007; Roa-Varón y Ortí, 2009), como es el caso del género *Eugerres*. Así, Ruiz-Carus y Uribe-Alcocer (2003) realizaron el estudio filogenético de la familia Gerreidae a partir de especies selectas de cada uno de los géneros con distribución en América (*Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri* y *Diapterus auratus*); para tal fin, utilizaron ADN mitocondrial y aloenzimas para reconocer la validez de la estructura taxonómica hasta entonces propuesta y establecieron la condición de hermandad entre los géneros *Eugerres* y *Diapterus*. En este mismo sentido, Benítez-Cortés (2004) llevó a cabo evaluaciones de un fragmento de la subunidad 16S del ADN ribosomal, de especies selectas representativas de cada género (*Diapterus brevirostris*, *Eucinostomus dowii*, *Eugerres lineatus*, *Gerres cinereus* y *Ulaema lefroyi*), respaldando la monofilia de la familia. En tanto Chen *et al.* (2007), por medio del empleo de secuencias de ADN mitocondrial (12S y 16S) y de ADN nuclear (RAG1 y Rhodopsin), confirmaron la condición monofilética de la familia Gerreidae y además sugieren subdividirla en dos subgrupos: *Diapterus* - *Eugerres* y *Eucinostomus* - *Gerres*; asimismo establecen la posición de la familia como grupo basal dentro de la Serie Percomorpha.

Respecto a la utilidad de marcadores moleculares para la identificación de especies de la familia Gerreidae, Chakraborty *et al.* (2005) llevaron a cabo la comparación de una porción de ARN mitocondrial (16S rARN) de dos formas cromáticas de la especie *Gerres erythourus* (Bloch, 1791), a partir de lo cual demostraron que los haplotipos de cada forma son recíprocamente monofiléticos, asimismo y con base en la divergencia genética estimada entre las dos formas analizadas y, el rango de distribución geográfica de cada forma, establecieron que deben ser tratadas como especies taxonómica y filogenéticamente distintas.

JUSTIFICACIÓN

El género *Eugerres* es un grupo que ha presentado diversos problemas taxonómicos, desde su identidad genérica (Deckert, 1973) hasta confusiones en la identificación de sus especies (Castro-Aguirre *et al.*, 1999). Recientemente, estudios realizados sobre las relaciones evolutivas del género, así como de la variación morfológica entre sus especies (González-Acosta, 2005; González-Acosta *et al.*, 2005; González-Acosta *et al.*, 2007a; Miranda-Marín y González-Acosta, 2012) han permitido esclarecer una precisa definición de sus especies mediante el establecimiento de diagnósticos completos; sin embargo, las hipótesis acerca de la monofilia del género, así como la posición taxonómica del componente dulceacuícola con relación al componente marino-estuarino, son dudosas. De tal modo, llevar a cabo los estudios sobre la sistemática de éste grupo, los cuales incluyan información de tipo molecular, ayudarán en gran medida a la resolución de problemas de índole taxonómico y filogenético, que a su vez permitirán generar información con mayor detalle que contribuya a comprender el origen y diversificación de este grupo de peces.

HIPÓTESIS

Los modelos evolutivos logrados mediante el empleo de marcadores moleculares permitirán corroborar la monofilia del género *Eugerres*, establecida de forma previa, a partir del empleo de caracteres de tipo morfológicos (merísticos, morfométricos y osteológicos).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la monofilia del género *Eugerres*, a partir de la reconstrucción filogenética del grupo, por medio del empleo de un marcador molecular y la aplicación de tres métodos de inferencia filogenética: Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estimar las distancias genéticas entre las especies del género *Eugerres* y grupos afines.

Evaluar la posición taxonómica del componente dulceacuícola, con relación al conjunto de especies del grupo interno de afinidad marino-estuarina.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio que se presenta se llevó a cabo por medio de la reconstrucción filogenética del género *Eugerres*, para lo cual se incluyeron como parte del grupo interno (GI), a siete de las ocho especies reconocidas como válidas en su taxonomía alfa: *E. awlae*, *E. axillaris*, *E. brasilianus*, *E. castroaguirrei*, *E. lineatus*, *E. mexicanus* y *E. plumieri*) y, como parte del grupo externo (GE), a tres especies representativas de otros géneros americanos de la familia Gerreidae: *Diapterus brevirostris*, *Eucinostomus currani* y *Gerres cinereus* (Figura 2), ver Anexo 1.

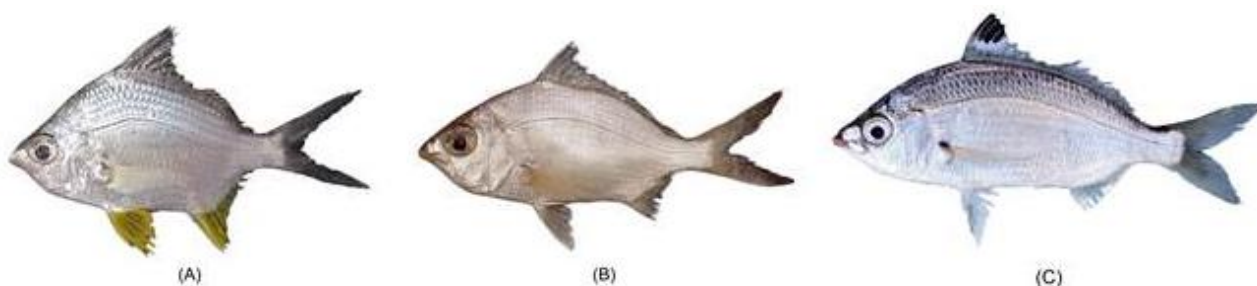


Figura 2. Especies asignadas como grupo externo dentro del análisis filogenético desarrollado. (A) *Diapterus brevirostris*, (B) *Gerres cinereus* y (C) *Eucinostomus currani*.

Eugerres brevimanus, fue la única especie del género que no pudo ser incluida en el estudio, debido a la dificultad para su recolecta en sus áreas de distribución conocida. Por lo tanto, las inferencias filogenéticas realizadas en este estudio tendrán una denotación parafilética; término que se refiere a grupos que excluyen dentro de la topología resultante a algunos de los descendientes del ancestro común.

Obtención de muestras biológicas

Para este fin se recolectaron ejemplares de la mayoría de las especies que componen al género *Eugerres*, a través de una serie de muestreos biológicos que incluyeron: la realización de arrastres en playa con chinchorro (2 cm de abertura de

mallas), lances con atarraya (1.5 cm de abertura de malla) y arponeo, de acuerdo con las características geomorfológicas de los sitios donde se llevó a cabo la captura. La distribución de los ejemplares recolectados corresponde a las vertientes costeras del Pacífico oriental tropical (POT), Atlántico occidental tropical (AOT) y ambientes dulceacuícolas de la región Neotropical (sureste) de México. Los sitios de muestreo para el POT se encuentran en Baja California Sur y Chiapas; mientras que los organismos con distribución en el AOT, fueron obtenidos mediante recolectas en Veracruz y Quintana Roo. Los especímenes dulceacuícolas (*E. mexicanus* y *E. castroaguirrei*), fueron recolectados en diferentes sitios a lo largo de la cuenca del sistema Grijalva-Usumacinta (Chiapas y Tabasco).

Los ejemplares recolectados en Chiapas y Tabasco fueron identificados y catalogados en el Laboratorio de Ictiología de El Colegio de la Frontera Sur, unidad San Cristóbal de las Casas, Chiapas; mientras que los ejemplares recolectados en B.C.S., Veracruz y Quintana Roo se identificaron en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, donde se encuentran resguardados. La identidad taxonómica de cada ejemplar se determinó con base en las características morfológicas y merísticas mencionadas en las claves de identificación propuestas por Castro-Aguirre *et al.* (1999), González-Acosta *et al.* (2005 y 2007 a, b) y las diagnósticos descritas en González-Acosta y Rodiles Hernández (2013).

De cada uno de los ejemplares recolectados, se tomaron muestras de una porción de tejido muscular, las cuales se preservaron en alcohol al 96% y dentro de tubos Eppendorf. Dichas muestras fueron trasladadas para su análisis genético al Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM).

Extracción de ADN, amplificación conducida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación

El ácido desoxirribonucleico (ADN) total del tejido muscular que previamente había sido preservado en 96% de etanol, fue extraído mediante la técnica de Fenol-

Cloroformo, protocolo mediante el cual es posible obtener ADN libre de proteínas y enzimas (ver Anexo 2).

Una vez obtenido el ADN total, se procedió a su amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual tiene como objetivo la obtención de un gran número de copias a partir de un fragmento de ADN, que para el caso consistió de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI).

La técnica de la PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo del Centro Canadiense para la Amplificación del Código de Barras de la Vida (citocromo c oxidasa subunidad 1), desarrollado por Ivanova y Graninger (2006) (ver Anexo 3).

Los primers utilizados para la secuenciación del fragmento de gen mitocondrial COI, son los que a continuación se muestran y que fueron diseñados por Ward *et al.* (2005):

FishCO1 LBC (5´ - TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC- 3´)

FishCO1H (3´ - ACT TCY GGG TGR CCR AAR AAT CA - 5´)

Cada reacción fue realizada empleando un volumen de 10.5 µl, conteniendo: 6.25 µl de trehalosa (10%), 2 µl de agua bidestilada (ddH₂O), 1.25 µl de solución buffer (10X), 0.625 µl de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) de concentración 50mM, 0.125 µl de cada primer, 0.0625 µl de desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) de concentración 10mM y 0.06 µl de polimerasa (5U/ µl). Las condiciones de termociclador fueron: 1) inclusión en temperatura de 94°C por 1 minuto para la desnaturalización; 2) 5 ciclos a 94°C durante 30 segundos; 3) inclusión en temperaturas de 45-50 °C por 40 segundos para la alineación; 4) inclusión en temperatura de 72°C por 1 minuto para la extensión; 5) 30-35 ciclos a temperatura de 94°C por 30 segundos; 6) inclusión en temperaturas de 51-54°C por 40 segundos; 7) inclusión a temperatura de 72°C por 1 minuto; 8) inclusión a temperatura de 72°C por 10 minutos para la extensión final; 9) inclusión a temperatura de 4°C en pausa indefinida del proceso de amplificación. El éxito de la amplificación fue confirmado con una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Todas las amplificaciones fueron enviadas a secuenciar al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM). Las amplificaciones

fueron secuenciadas en ambos sentidos (5'-3'; 3'-5'), empleando para cada fragmento los mismos primers utilizados en sus amplificaciones.

De modo adicional, cinco secuencias del fragmento mitocondrial (COI) de *E. brasiliensis* y dos secuencias de *E. curranii* (Tabla I), fueron obtenidas de la base de datos del Sistema de Código de Barras de la Vida-BOLDSsystems, las cuales están disponibles en las siguientes ligas de internet:

E. brasiliensis: http://www.boldsystems.org/index.php/Public_SearchTerms

E. curranii: http://www.boldsystems.org/index.php/Public_SearchTerms

Tabla I. Números de acceso de las secuencias obtenidas en sitio web del Centro Canadiense para la Amplificación del Código de Barras de la Vida BOLD-Systems (http://www.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records)

Especie	COI	Referencia bibliográfica
<i>Eugerres brasiliensis</i>	MFSP495-10	Oliveira-Ribeiro <i>et al.</i> , 2012
	MFSP496-10	
	MFSP497-10	
	MFSP598-10	
	MFSP561-10	
<i>Eucinostomus curranii</i>	ANGBF10650-12	Gleason <i>et al.</i> , 2009
	ANGBF1238-12	

Análisis de datos

Las secuencias de COI fueron editadas y arregladas manualmente con ayuda del programa de cómputo BioEdit (Hall, 1999). El alineamiento se llevó a cabo empleando el algoritmo de Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), implementado en el programa BioEdit (Hall, 1999). Una vez obtenido el alineamiento de las secuencias se llevó a cabo la reconstrucción de la filogenia de *Eugerres*, por medio de la construcción de cladogramas y a partir de la aplicación de tres métodos de inferencia filogenética: Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano.

Análisis de Máxima Parsimonia

El análisis de Máxima Parsimonia se llevó a cabo con ayuda del software TNT versión 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008), para poder obtener un modelo filogenético que representara el menor número de pasos evolutivos. El criterio de optimización utilizado fue el de Fitch, el cual es una generalización del método de Wagner que comúnmente es utilizado para caracteres de tipo multiestado y desordenados, tales como las secuencias de proteínas o de nucleótidos empleados en el presente estudio. Se asignó igual peso a los caracteres, mismos que fueron tratados como no aditivos o desordenados, ya que cada estado de carácter podría derivar directamente de cualquier otro (*v.gr.*, el cambio del estado de carácter A, T, G o C a cualquier otra base nitrogenada vale un paso). El algoritmo utilizado para la búsqueda del árbol más parsimonioso o de menor longitud fue de tipo heurístico. El método que se utilizó para la búsqueda del árbol más parsimonioso, fue por medio de la reconexión y bisección del árbol o TBR (por sus siglas en inglés: Tree Bisection Recombination), con adición aleatoria de taxa al árbol inicial (10 000 réplicas). El árbol de consenso se determinó con base en los valores calculados de los índices de consistencia y de retención, considerados como medida de la homoplasia presente en el conjunto de datos (valores cercanos a 0 implican un alto grado de homoplasias, mientras que valores cercanos a 1, representan pocas homoplasias). Por último, el soporte de los nodos fue determinado a través del estimador de *bootstrap* no paramétrico con 10 000 seudoréplicas.

Asignación de un modelo explícito de sustitución

A diferencia del análisis de Máxima Parsimonia, en los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, es requisito indispensable la asignación de modelos explícitos de sustitución; es decir, se debe seleccionar un modelo que explique la probabilidad con la que ocurre determinado evento de sustitución dentro de las secuencias genéticas que se analizan. Asimismo, para la selección del modelo que mejor explique el comportamiento de los datos, se utilizó el Criterio de Información

de Akaike (Akaike, 1974), el cual fue estimado mediante el programa computacional JModelTest 2.1.1. (Posada, 2008); dicho criterio otorga una medida de la calidad de los modelos estadísticos que pretenden utilizarse (a partir de valores de máxima verosimilitud expresados en $-Ln$), penalizando cada parámetro dentro del modelo que se asigna y con base en ello es posible seleccionar a partir de 24 modelos de sustitución, el que mejor se ajuste a los datos.

Análisis de Máxima Verosimilitud

Para obtener el árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud (ML por sus siglas en inglés) y el soporte de sus nodos con valores Bootstrap, se utilizó el software RaxML (Stamatakis, 2006). Este programa de cómputo funciona en su totalidad por medio de una línea de comandos, los cuales pueden consultarse en el manual (<http://sco.h-its.org/exelixis/oldPage/RAXML-Manual.7.0.4.pdf>). El alineamiento utilizado en este caso, fue transformado a formato PHYLIP relajado, procedimiento que consiste en generar un archivo de texto simple, donde en el primer renglón representa el número de taxa, separado por un espacio del número de caracteres; en los renglones subsecuentes se anexan los datos de cada especie (ANEXO 5). Cada renglón debe iniciar con el nombre de un taxón (máximo 256 caracteres) y estar separado por un espacio de la información de las secuencias, después debe haber un “retorno” y en el siguiente renglón se debe ingresar el nombre del segundo taxón, separado también por al menos un espacio de información de las secuencias, este procedimiento se sigue hasta completar el número total de taxa a incluir en el análisis. Una vez que se corroboró que RaxML pudo leer dicho archivo, se corrió un análisis mediante el cual se obtuvo simultáneamente un árbol de ML y valores asociados de bootstrap. En este caso se especificó de acuerdo con el criterio propuesto por Tavaré (1986), que el grupo externo en este caso correspondiera a la especie *G. cinereus*; mientras que el número de 500 réplicas bootstrap y el modelo de sustitución asignado a la búsqueda, se asignó al de Tiempo General Reversible con sitios invariables y una distribución Gama (GTR+I+G, por sus siglas en inglés), debido a que es el modelo con los parámetros de sustitución más cercanos al seleccionado

por el Criterio Información de Akaike (modelo de transiciones con distribución Gama, TIM2+G):

```
./raxmlHPC -f a -s TODOS.phy. -x 12345 -# 500 -m GTRCAT -o Gc_ECO04  
-n TODOS1
```

El archivo generado (RAxML_bipartitions), contenía el árbol de máxima verosimilitud encontrado con valores de apoyo bootstrap en sus ramas; dicho árbol fue visualizado y editado con ayuda del programa FigTree versión 1.1.1 (Rambaut, 2006-2008).

Análisis Bayesiano

Para este tipo de análisis se utilizó el programa de cómputo Mr.Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), mediante el cual se pudo realizar la búsqueda de dos cadenas de Monte Carlo (por sus siglas en inglés MCMC). El modelo de sustitución asignado en dicha búsqueda, fue de tiempo general reversible con sitios invariables y una distribución gama (GTR+I+G). Se corrieron diez millones de generaciones con cuatro cadenas (una fría y tres calientes) y con el parámetro de temperatura establecido en 0.2, incrementando el calentamiento de la cadena. Los árboles generados fueron muestreados cada 100 generaciones a partir de un total de 10 000 000 generaciones. Los criterios a seguir fueron:

Temperatura = 0.2

Frecuencia de muestreo = 100

Número de cadenas = 4

Número de corridas = 2

Generaciones=10 000 000

Modelo de sustitución utilizado (modelo con los parámetros de sustitución más cercano al seleccionado por el Criterio Información de Akaike, TIM2+G) = GTR+I+G (General Time Reversible, con sitios invariables y una distribución Gama).

Para evaluar el punto de convergencia de las cadenas durante el proceso de búsqueda se utilizó el programa Tracer v 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007). En este caso se eliminó el principio del muestreo, ya que los valores de verosimilitud son cambiantes y van en aumento; esta rutina es conocida como *burn-in* y consistió en eliminar el primer millón de generaciones en el muestreo, obteniendo con ello topologías con valores casi idénticos de verosimilitud.

Cálculo de distancias genéticas

Las distancias genéticas fueron calculadas mediante el método del vecino más cercano o “neighbor joining” (NJ) con el programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando un modelo de sustitución de transiciones con distribución Gama (TIM2+G); modelo que mostró el mejor ajuste con los datos aquí analizados, de acuerdo con la prueba basada en el Criterio de Información de Akaike (Akaike, 1974), la cual fue realizada con el programa computacional JModelTest (Posada, 2008). A partir de los valores obtenidos de las distancias genéticas, se generó un dendrograma y dos matrices de distancias, las cuales fueron utilizadas para comparar el porcentaje de distancia genética existente entre cada una de las especies del grupo interno. Con el fin de comparar el grado de diferenciación genética a nivel supraespecífico, entre las especies del género *Eugerres* y grupos relacionados, se calcularon las distancias genéticas a partir de agrupaciones establecidas a priori. El GI fue separado en dos grupos; uno representado por las especies de distribución marino-estuarina y, el otro, compuesto por aquellas especies con distribución en ambientes dulceacuícolas. En tanto que las especies del GE (*D. brevirostris*, *E. currani* y *G. cinereus*), fueron considerados como representantes a nivel genérico.

RESULTADOS

A partir de un total de 61 secuencias genéticas (ver anexos 4 y 5) correspondientes a siete especies del género *Eugerres* (grupo interno = GI) y tres especies que representaron al grupo externo (GE) y de la aplicación de los métodos de inferencia filogenética seleccionados, fue posible el planteamiento de tres hipótesis sobre la historia evolutiva del género de interés y sus especies. La longitud de las secuencias genéticas fue de 652 pares de bases con una composición del 29.9% de Citocinas, 27.9% de Timinas, 22.5% de Adeninas y 19.8% de Guaninas. Fueron 211 sitios informativos y 226 sitios fueron variables (28 en la primera posición, 7 en la segunda y 191 en la tercera). En los párrafos subsecuentes se describen las topologías de los árboles resultantes:

Análisis de Máxima Parsimonia

El análisis de máxima parsimonia realizado por medio del método de búsqueda heurística para 652 caracteres, correspondientes a la longitud de cada una de las secuencias genéticas de COI, de siete especies del género *Eugerres* y tres especies como parte del grupo externo (*Diapterus brevirostris*, *Eucinostomus currani* y *Gerres cinereus*); dio como resultado la generación de 120 cladogramas, todos igualmente parsimoniosos (con el menor número de pasos) con una longitud (L) de 691 pasos. El índice de consistencia (IC) estimado fue de 0.72 y el índice de retención (IR) igual a 0.94. En las Figuras 3 y 4 se presentan los cladogramas de consenso estricto donde se aprecian los valores bootstrap que indican el porcentaje de confianza de los nodos generados por el análisis (10 000 repeticiones). De modo particular, en la Figura 4 se representa una interpretación simplificada de los resultados mostrados en la Figura 3. La topología derivada de este análisis muestra una estructura compuesta de siete nodos y diversas ramificaciones, las cuales incluyen al GE: *Gerres cinereus* (nodo A), *Eucinostomus currani* (nodo B, soportado con un 100% bootstrap) y *Diapterus brevirostris* (nodo C, soportado con un 88% bootstrap); y al GI conformado por dos clados: el nodo D que agrupa a las especies con distribución en ambientes marino-

estuarinos (soportado con un 48% bootstrap) y un clado independiente dentro del nodo C que agrupa a las especies *Eugerres* con distribución en ambientes dulceacuícolas.

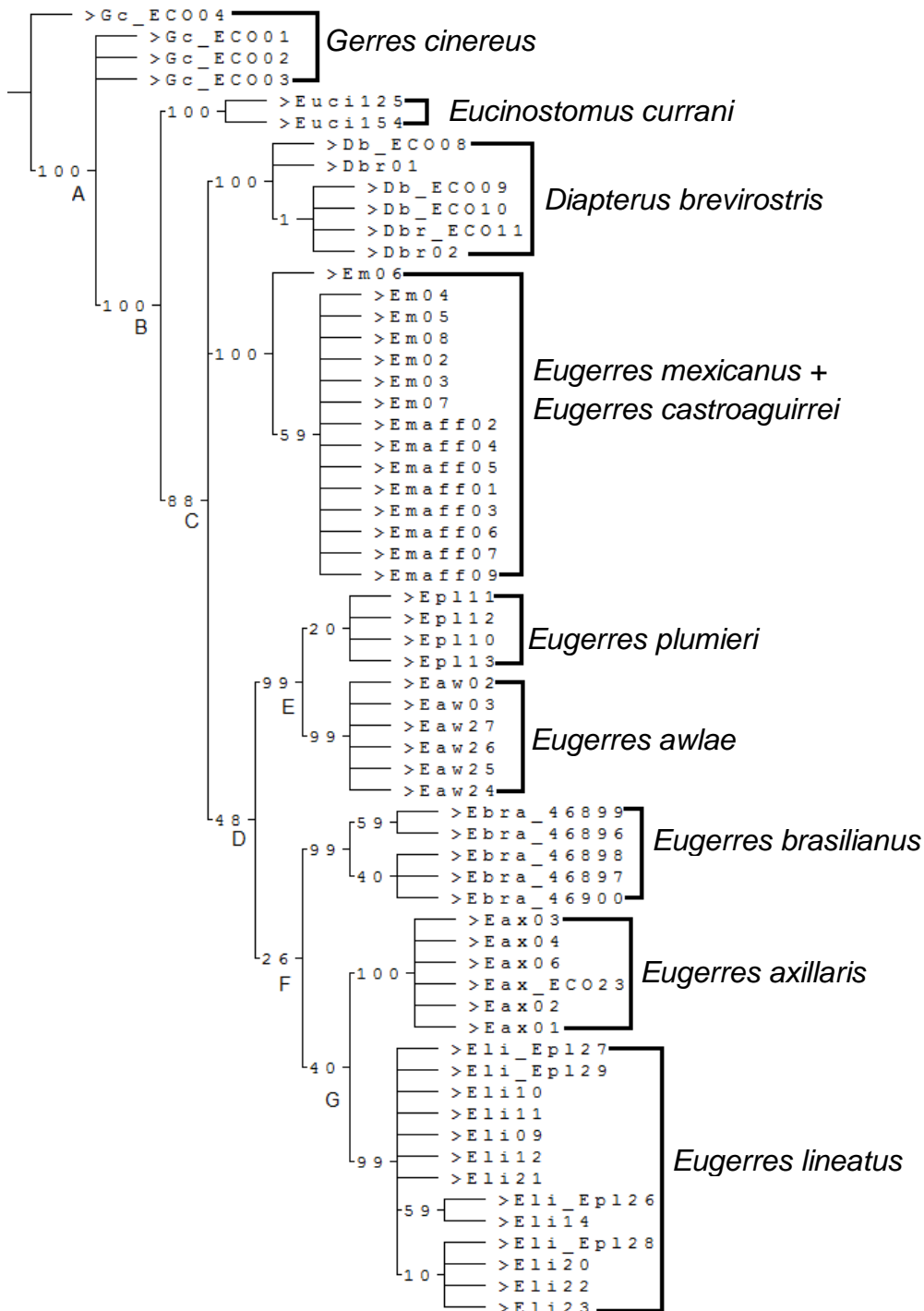


Figura 3. Cladograma de consenso derivado del análisis de Parsimonia. Los números en las ramas indican el soporte de cada nodo (basado en el índice de "bootstrap" con 10 000 repeticiones).

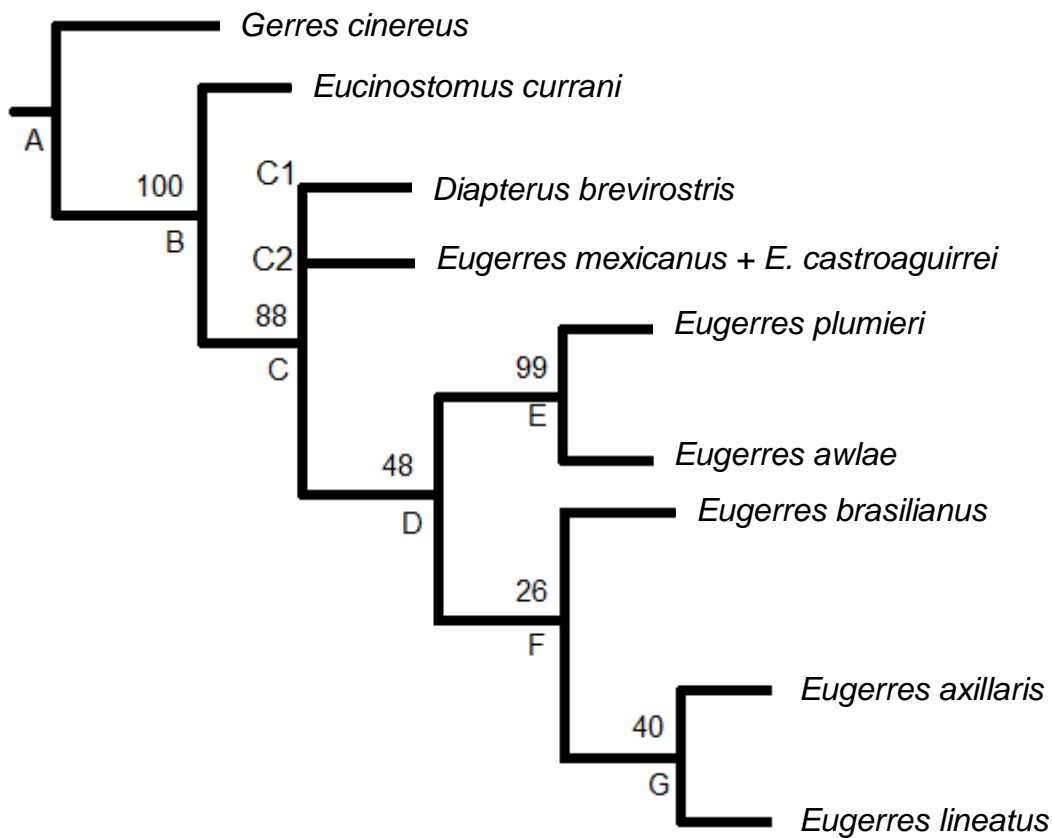


Figura 4. Cladograma de consenso simplificado, derivado del análisis de Parsimonia. Los números sobre las ramas indican el soporte de cada nodo (índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones).

Nodo C

En el nodo C (soportado con un 88% bootstrap) que incluye al GI, se aprecia un origen filogenético independiente de los clados C1, en el que se agrupa *D. brevirostris*; clado C2 (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*) que contiene al componente dulceacuícola del género *Eugerres* y el clado C3 o nodo D (soportado con un 48% bootstrap), que incluye a las especies de *Eugerres* con distribución en ambientes marino-estuarinos. De lo anterior se desprende que la lectura del nodo C, permite suponer un origen polifilético-parafilético del género *Eugerres* (Figura 4), lo que contrasta con la hipótesis establecida para este estudio.

Nodo D

De acuerdo a la topología de este nodo (soportado con un 48% bootstrap), se establece que el componente marino-estuarino del género *Eugerres* podría ser un grupo monofilético, en donde las ramas terminales del nodo indican la condición fraterna de *E. plumieri* y *E. awlae*, es decir como especies hermanas con distribución en la vertiente del Atlántico occidental (nodo E, soportado con un 99% bootstrap); además de una posible relación Atlántico-Pacífico (nodo F) entre algunas especies del GI; *E. brasilianus* de distribución en el Atlántico occidental y *E. axillaris* y *E. lineatus*; ambas de distribución en el Pacífico oriental.

Nodo F

Las ramificaciones que derivan de este nodo (soportado con un 26% bootstrap), permiten distinguir dos grupos: uno formado por *E. brasilianus* con distribución en la vertiente costera del Atlántico occidental, además de otro grupo compuesto por *E. axillaris* y *E. lineatus*, con distribución en el Pacífico oriental (nodo G).

Nodo G

Este nodo (soportado con un 40% bootstrap) está compuesto por dos ramas que contienen a *E. axillaris* y a *E. lineatus*, ambas especies con distribución en el Pacífico oriental.

Análisis de Máxima Verosimilitud

Se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud con un valor de Ln -1883 (Figura 5), en el cual se aprecian los valores Bootstrap que indican el porcentaje de confianza de los nodos generados por el análisis (10 000 repeticiones). La topología derivada de este análisis muestra una estructura compuesta de ocho nodos y diversas ramificaciones, las cuales incluyen al GE conformado por especies emparentadas con el género *Eugerres* (GI): *Gerres cinereus* (nodo A, rama A2), *Eucinostomus currani* (nodo B, rama B2) y *Diapterus brevirostris* (nodo D, rama D2) que quedó como parte del mismo clado que las especies de *Eugerres* con distribución en ambientes

dulceacuícolas (nodo D, rama D1). Aquellas especies de *Eugerres* con distribución en ambientes de tipo marino-estuarino conformaron un clado representado por el nodo E.

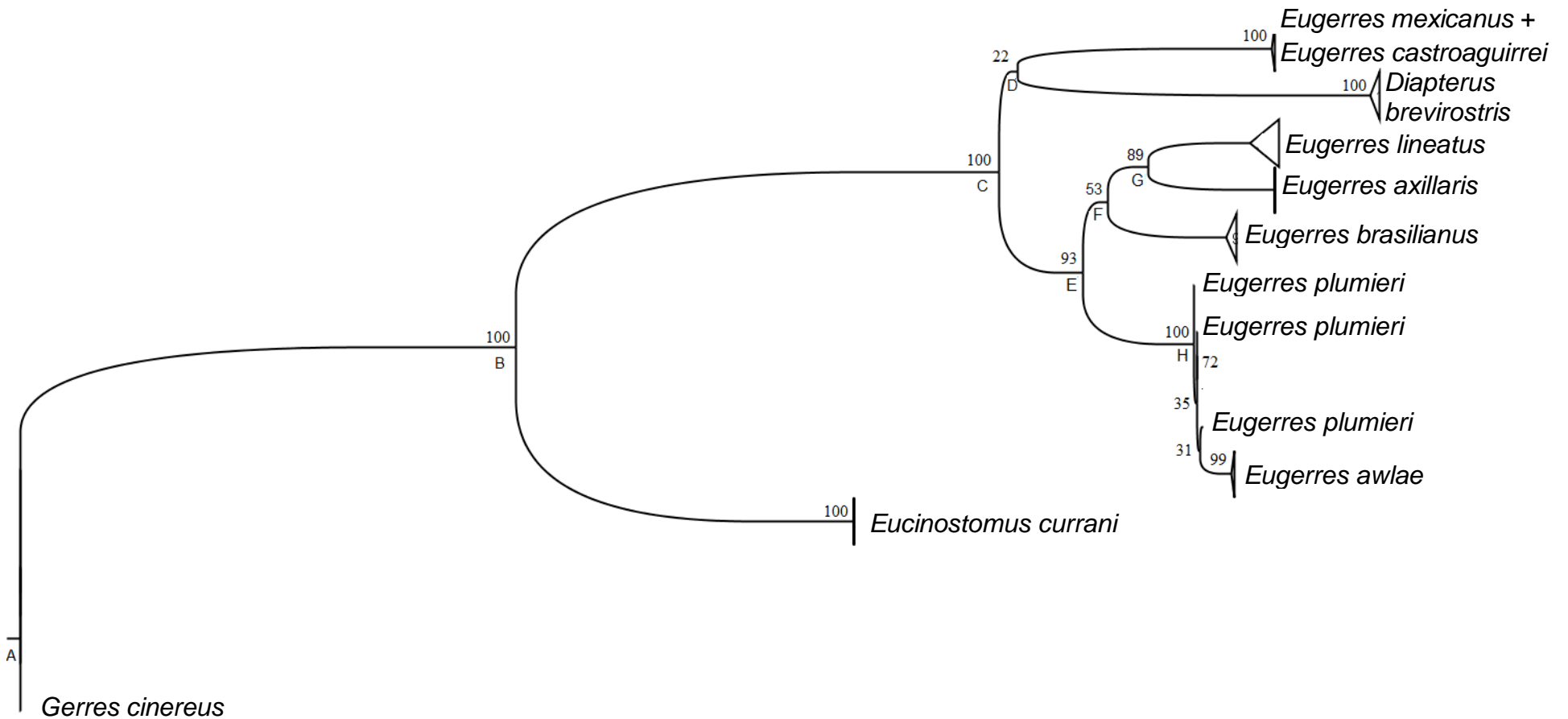


Figura 5. Cladograma derivado del análisis de Máxima Verosimilitud. Valor de máxima verosimilitud Ln -1883. Los números sobre las ramas indican el soporte de estas (índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones). El tamaño de los triángulos presentados en las ramas terminales indica el grado de variabilidad intraespecífica.

Nodo C

Este nodo soportado un 100% bootstrap, incluye al GI y a la especie hermana de *Eugerres* (*D. brevirostris*). Su topología denota el origen independiente del GI: nodo D (*D. brevirostris*, *E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*) y nodo E (*Eugerres* spp. de distribución en ambientes de tipo marino-estuarino), lo que contrasta con la hipótesis establecida para este estudio.

Nodo D

Las ramificaciones que derivan de este nodo (soportado con un 22% bootstrap), separan a la especie hermana del género *Eugerres* (*D. brevirostris*) y al componente dulceacuícola (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*).

Nodo E

Las ramas terminales de este nodo (soportado con un 93% bootstrap) indican una posible relación Atlántico-Pacífico (nodo F) entre las especies del GI con distribución marino-estuarina (*E. brasilianus*, *E. axillaris* y *E. lineatus*) y la condición de *E. plumieri* y *E. awlae*, como especies hermanas con distribución en la vertiente del Atlántico occidental (nodo H, soportado con un 99% bootstrap).

Nodo F

Las ramificaciones que derivan de este nodo (soportado con un 53% bootstrap), permiten distinguir dos grupos o clados: uno compuesto por *E. lineatus* y *E. axillaris*, ambas con distribución en el Pacífico oriental (nodo G) y otro grupo formado por *E. brasilianus* (rama F2) con distribución en la vertiente costera del Atlántico occidental. Tal condición podría ser reflejo de una posible relación ancestral entre ambas cuencas oceánicas.

Nodo G

Este nodo (soportado con un 89% bootstrap) está compuesto por dos ramas que contienen a *E. lineatus* y a *E. axillaris* (rama G₂), respectivamente; ambas especies comparten su área de distribución en el Pacífico oriental.

Análisis de Inferencia Bayesiana

La topología derivada del análisis de Inferencia Bayesiana, resultó muy similar a la obtenida mediante los métodos de inferencia antes comentados. En la Figura 6 se presenta el cladograma de máxima probabilidad posterior derivado de este análisis, donde se aprecian los valores de probabilidad posterior que indican el valor de probabilidad de ocurrencia de los nodos generados por el análisis. La topología derivada del análisis de Inferencia Bayesiana muestra una estructura compuesta por siete nodos y diversas ramificaciones, las cuales incluyen por un lado al GE conformado por las especies consideradas como parte del grupo externo: *Gerres cinereus* (rama A₁, nodo A), *Eucinostomus currani* (rama B₂, nodo B) y *Diapterus brevirostris* (rama C₃, nodo C) y por otra parte al GI que está formado por dos clados: el nodo D que agrupa a las especies con distribución en ambientes marino-estuarinos y un clado independiente dentro del nodo C que agrupa a las especies de distribución en ambientes dulceacuícolas.

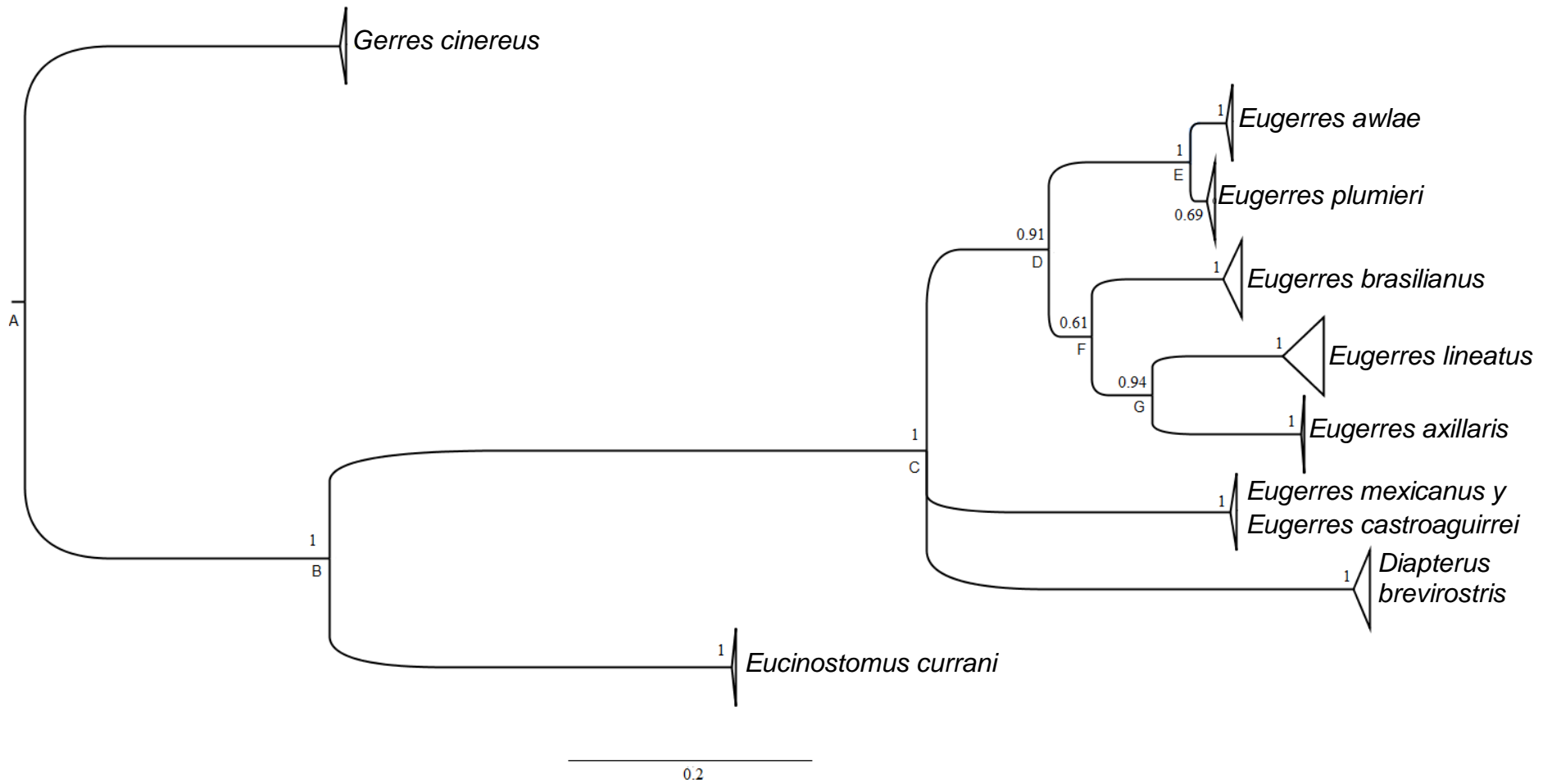


Figura 6. Cladograma obtenido a partir de un análisis de Inferencia Bayesiana. Los números sobre cada rama representan el valor de probabilidad posterior (valores cercanos a 1 representan el 100% de certidumbre en la hipótesis planteada), mientras que el tamaño de los triángulos presentados en las ramas terminales indica el grado de variabilidad intraespecífica.

Nodo C

En el nodo C (soportado con una probabilidad del 100% o 1) que incluye al GI y a un representante del GE (*Diapterus brevirostris*), se observa el origen independiente de los clados representados en el nodo D (*Eugerres* spp. con distribución marino-estuarina), C2 (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*) y C3 (*D. brevirostris*). La lectura de este nodo permite establecer un origen parafilético-polifilético del género *Eugerres*, lo que contrasta con la hipótesis establecida para este estudio.

Nodo D

Las ramas terminales de este nodo (soportado con una probabilidad de 0.91) indican la condición de *E. plumieri* y *E. awlae* como especies hermanas (nodo E); y una posible relación Atlántico-Pacífico entre las especies del GI con distribución marino-estuarina (nodo F).

Nodo F

Las ramificaciones que derivan de este nodo (soportado con una probabilidad de 0.61), permiten distinguir dos grupos: uno formado por *E. brasilianus* con distribución en la vertiente costera del Atlántico occidental tropical y otro grupo, compuesto por *E. lineatus* y *E. axillaris*, especies con distribución en el Pacífico oriental (nodo G).

Nodo G

Este nodo (soportado con una probabilidad de 0.94) está compuesto por dos ramas que contienen a *E. lineatus* y a *E. axillaris*, ambas especies con distribución en el Pacífico oriental.

Cálculo de distancias genéticas

En la Figura 7 se muestra el dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas basadas en un modelo evolutivo (TIM2+G, modelo de sustitución de transiciones con distribución gama).

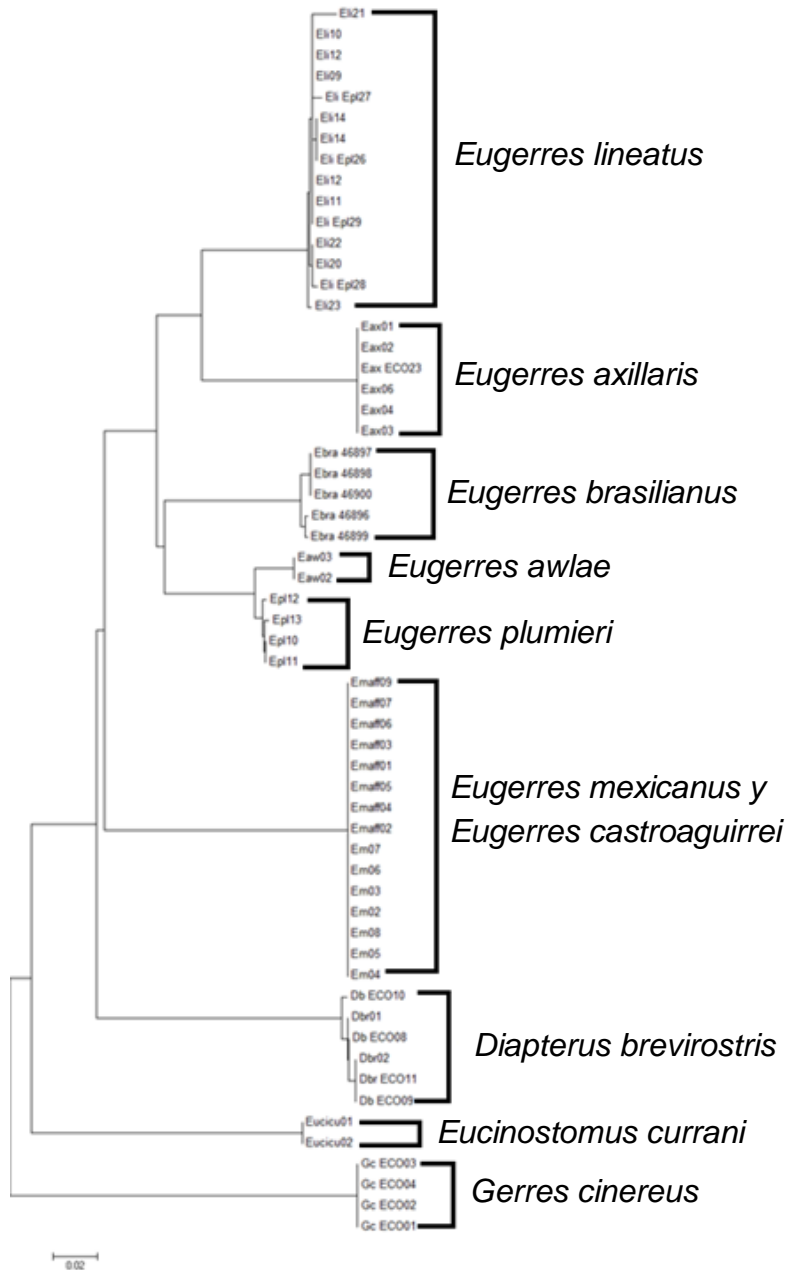


Figura 7. Dendrograma basado en el método del vecino más cercano (NJ), obtenido a partir del cálculo de la divergencia nucleotídica de las secuencias de citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), para especies del género *Eugerres* y grupos hermanos. La estimación fue realizada a partir de la elección de un modelo de transiciones con distribución gama (TIM2+G).

En la Tabla II se presenta la matriz con los porcentajes de diferenciación genética a nivel interespecífico, a partir de la cual se determinó un porcentaje de diferenciación nulo (0%) entre *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei*. Asimismo se determinó que el menor porcentaje de disimilitud (2.2%) correspondió al grupo formado por *E. awlae* y *E. plumieri*; mientras que las especies con mayor diferenciación genética correspondieron al conjunto formado por *G. cinereus* y las especies del componente dulceacuícola de *Eugerres* (31.5%).

Tabla II. Distancias genéticas estimadas para las especies del género *Eugerres* y especies fraternas, mediante el método del vecino más cercano (NJ) y utilizando un modelo de sustitución de transiciones con distribución gama (TIM2+G). Los números en negritas indican los menores, mayores y nulos porcentajes de diferenciación genética.

	<i>E.</i> <i>awlae</i>	<i>E.</i> <i>plumieri</i>	<i>E.</i> <i>brasilianus</i>	<i>E.</i> <i>lineatus</i>	<i>E.</i> <i>axillaris</i>	<i>E.</i> <i>castroaguirrei</i>	<i>E.</i> <i>mexicanus</i>	<i>D.</i> <i>brevirostris</i>	<i>E.</i> <i>currani</i>	<i>G.</i> <i>cinereus</i>
<i>E. awlae</i>										
<i>E. plumieri</i>	2.2									
<i>E. brasilianus</i>	12.4	11.5								
<i>E. lineatus</i>	13.3	11.6	14							
<i>E. axillaris</i>	17.3	16.2	14	11.9						
<i>E. castroaguirrei</i>	18.8	17.7	18.9	20.4	23.3					
<i>E. mexicanus</i>	18.8	17.7	18.9	20.4	23.3	0				
<i>D. brevisrostris</i>	21.4	20	23.7	21.2	20.9	23.2	23.2			
<i>E. currani</i>	27.8	26.7	27.6	25.1	30.8	24.7	24.7	27.5		
<i>G. cinereus</i>	25.7	0.269	25.3	28.8	29.4	31.5	31.5	29.3	28.7	

En la Tabla III se muestran los porcentajes de diferenciación genética entre cada uno de los grupos establecidos. El mayor porcentaje de diferenciación se presentó entre el componente dulceacuícola del género *Eugerres* (*E. castroaguirrei* + *E. mexicanus*) y *Gerres cinereus* (31.5%); mientras que la menor distancia genética se presentó entre el componente dulceacuícola y el componente marino-estuarino del género *Eugerres* (20.1%). En esta tabla, se destaca en negritas el porcentaje de diferenciación genética que hay entre el componente dulceacuícola y el marino-estuarino del género *Eugerres*.

Tabla III. Porcentajes de diferenciación genética estimados a partir del cálculo de la divergencia nucleotídica de las secuencias de citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), para los componentes con distribución dulceacuícola y marino-estuarino de *Eugerres* spp. y grupos externos. Estimación realizada mediante la elección de un modelo de transiciones con distribución gama (TIM2+G).

Géneros y/o conjuntos ícticos	<i>Eucinostomus currani</i>	<i>Gerres cinereus</i>	<i>Diapterus brevirostris</i>	C. dulceacuícola de <i>Eugerres</i>	C. marino-estuarino de <i>Eugerres</i>
<i>Eucinostomus currani</i>					
<i>Gerres cinereus</i>	28.7				
<i>Diapterus brevirostris</i>	27.5	29.3			
C. dulceacuícola	24.7	31.5	23.2		
C. marino-estuarino	27.0	27.7	21.4	20.1	

Análisis filogenéticos sin incluir al componente dulceacuícola (*E. castroaguirrei* + *E. mexicanus*) como parte del género *Eugerres*

Derivado de los análisis filogenéticos realizados con los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, se determinó que el género *Eugerres* es un grupo cuyo origen es polifilético-parafilético. A partir de las topologías obtenidas se estableció que tanto el componente dulceacuícola como el de afinidad marino estuarina de *Eugerres*, reflejan una historia evolutiva independiente. Por lo anterior, se llevó a cabo un análisis *a posteriori* con el fin de evaluar si con la exclusión del componente dulceacuícola, el género *Eugerres* refleja una condición monofilética. Para este fin se volvieron a correr los análisis de inferencia filogenética previamente comentados, manteniendo los criterios de búsqueda asignados de inicio en dicho análisis.

Análisis de Máxima Parsimonia (sin incluir al componente dulceacuícola del género Eugerres)

Con la exclusión del componente dulceacuícola en el análisis de Máxima Parsimonia (Figura 8), se pudo corroborar la monofilia-parafilia del género *Eugerres* conformado por las especies de distribución marino-estuarina, con un soporte del 32% bootstrap. También se estableció que *D. brevirostris* representa a la especie hermana del género *Eugerres* (88% bootstrap) y se corroboró la condición de *E. awlae* y *E. plumieri* (99% bootstrap) como especies hermanas distribuidas en la vertiente del Atlántico occidental.

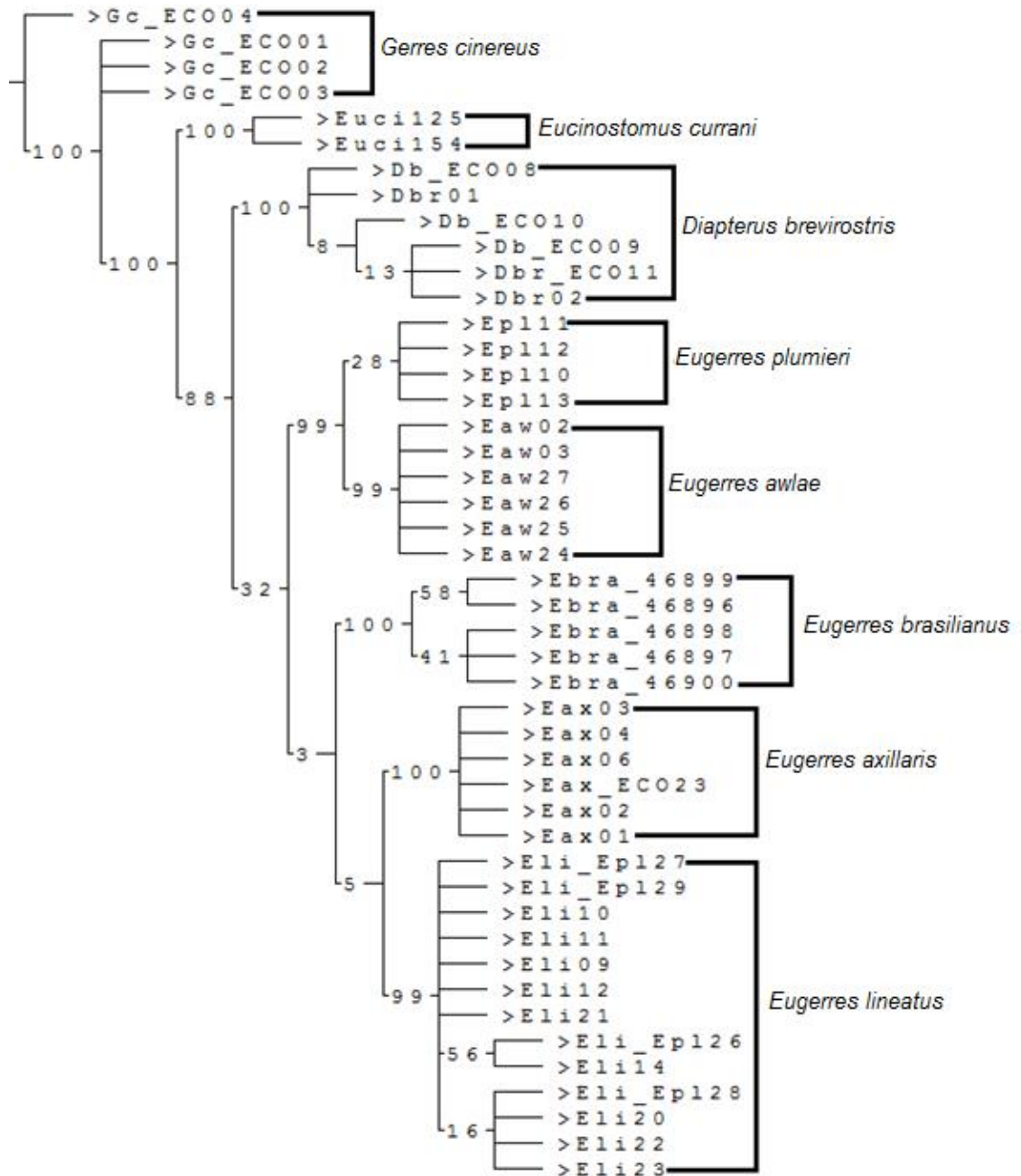


Figura 8. Hipótesis filogenética derivada del análisis de Parsimonia, sin incluir al componente dulceacuícola del género *Eugerres* (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*). Los números sobre las ramas indican su soporte a partir del índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones.

Análisis de Máxima Verosimilitud (sin incluir al componente dulceacuícola del género Eugerres)

Con relación al análisis de Máxima Verosimilitud (Figura 9), el clado que agrupa a las especies del género *Eugerres* quedó dividido en dos grupos principales: el primero soportado con un 47% bootstrap, integra a *D. brevirostris* y a tres especies de *Eugerres*, una con distribución en el Atlántico occidental (*E. brasilianus*) y dos con distribución en el Pacífico oriental (*E. lineatus* y *E. axillaris*); mientras que el segundo clado está integrado por *E. plumieri* y *E. awlae*, ambas especies con distribución en el Atlántico occidental. La topología resultante en este esquema, indica una condición polifilética-parafilética de *Eugerres*.

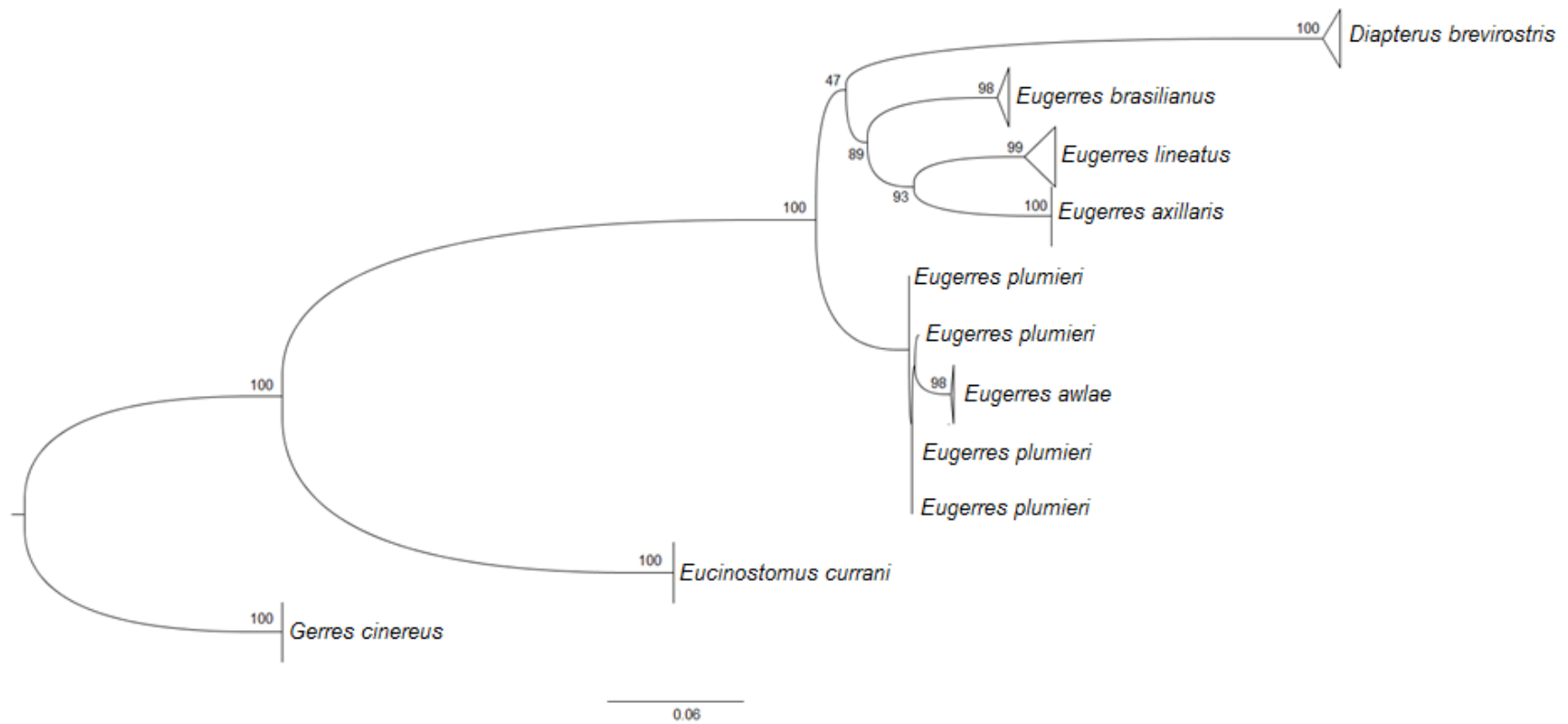


Figura 9. Hipótesis filogenética derivada del análisis de Máxima Verosimilitud, sin incluir al componente dulceacuícola del género (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*). Los números sobre las ramas indican su soporte a partir del índice de “bootstrap”, basado en 10 000 repeticiones.

Análisis de Inferencia Bayesiana (sin incluir al componente dulceacuícola del género Eugerres)

En lo que respecta al modelo derivado del análisis de Inferencia Bayesiana (Figura 10), el clado que incluye al GI muestra una politomía para la mayoría de los taxa involucrados, razón por la que se establece también una condición polifilética-parafilética o no resuelta de la filogenia de *Eugerres*.

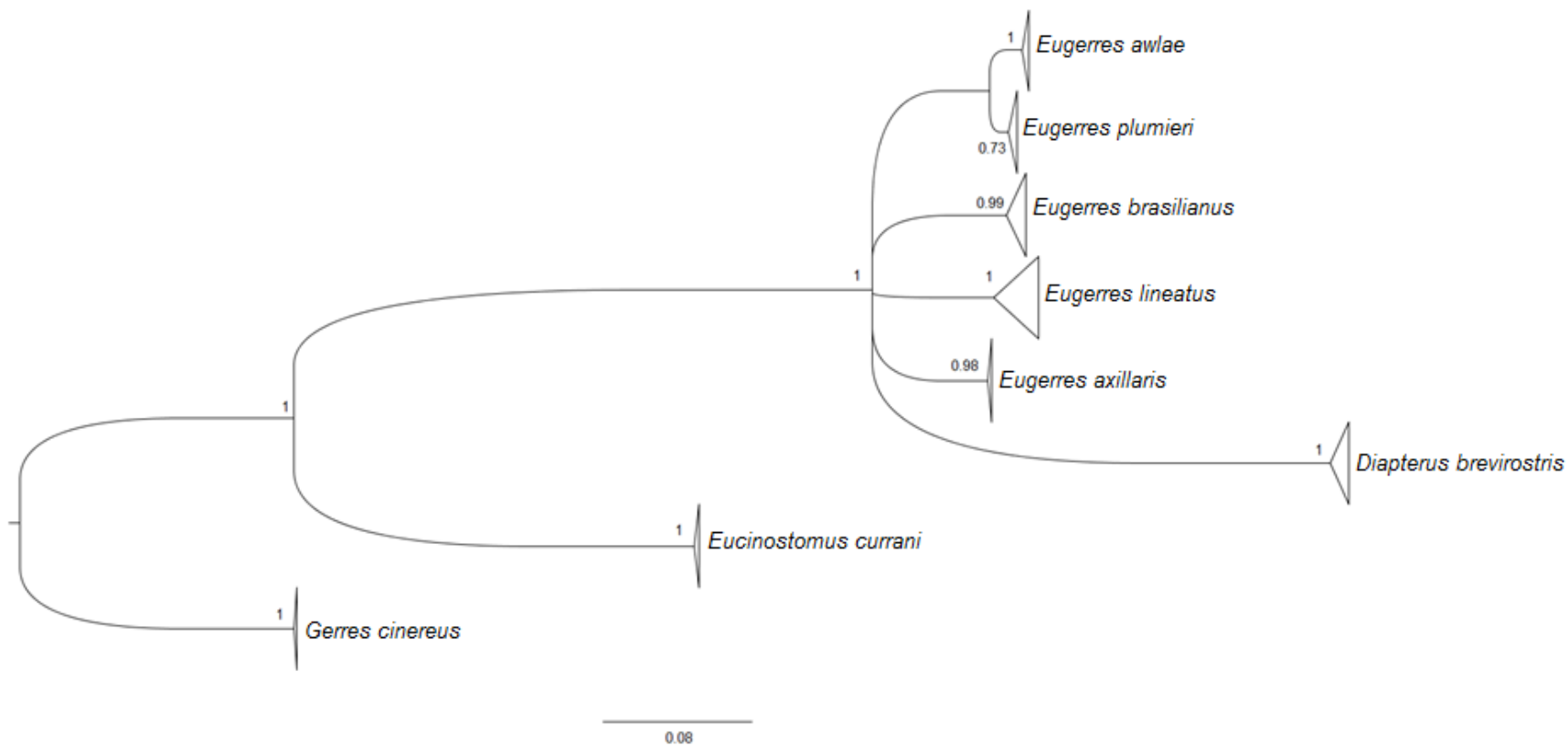


Figura 10. Hipótesis filogenética derivada del análisis de Inferencia Bayesiana, sin incluir al componente dulceacuícola del género (*E. mexicanus* + *E. castroaguirrei*). Los números sobre cada rama representan el valor de probabilidad posterior.

DISCUSIÓN

Los estudios de tipo taxonómico, llevados a cabo a través de la elaboración de listados o elencos de las especies existentes sobre la faz de la Tierra y las reconstrucciones filogenéticas sustentadas en la comprensión de su origen y diversificación, tienen importantes implicaciones dentro del conocimiento de la biodiversidad y la conservación de la biota (Morrone y Espinosa, 1998; Wiley y Lieberman, 2011).

En lo que concierne a los peces de la familia Gerreidae, que representan un recurso importante en nuestro país desde el punto de vista económico y ecológico, se han presentado problemas taxonómicos de tipo alfa que han ocasionado confusiones o errores al tratar de establecer las relaciones evolutivas entre sus especies; aunque en la actualidad estos problemas han sido abordados a través de un número importante de estudios (*v.gr.*, De la Cruz-Agüero, 2001; Ruiz-Carus y Uribe-Alcocer, 2003; González-Acosta, 2005; Burnes-Romo, 2009; Ortiz-Galindo, 2009; Álvarez-Pliego, 2009; Chollet-Villalpando, 2012; Vergara-Solana, 2012). De modo particular, el género *Eugerres* ha presentado también este tipo de dificultades en la identidad taxonómica de sus especies, tal es el caso de la confusión entre *E. axillaris* y *E. lineatus* (ver González-Acosta *et al.*, 2005); así como en el hecho de considerar a *E. awlae* como un sinónimo de *E. plumieri* (Deckert y Greenfield, 1987; Greenfield y Thomerson, 1997; Castro-Aguirre *et al.*, 1999; McEachran y Fechhelm, 2005). Más reciente es el planteamiento sobre la dudosa posición taxonómica del componente dulceacuícola (*E. castroaguirrei* y *E. mexicanus*) dentro del género *Eugerres* (Miranda-Marín, 2011; Miranda-Marín y González-Acosta, 2012; González-Acosta y Rodiles-Hernández, 2013). Este tipo de problemáticas en la taxonomía alfa de las especies, pueden esclarecerse mediante la exploración y análisis crítico de nuevas fuentes de información, como lo es en este caso, la implementación de marcadores moleculares dentro del análisis de tipo filogenético en este grupo de peces.

En la primera aproximación sobre la filogenia de *Eugerres* spp., realizada por González-Acosta (2005) con base en análisis de caracteres morfológicos de tipo merístico, morfométrico y osteológico, estableció que el género *Eugerres* tiene un

origen monofilético, es decir, que se trata de un grupo natural que incluye al ancestro y toda su descendencia. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos de la información de tipo molecular y de acuerdo con los tres métodos de inferencia filogenética empleados, en este trabajo se establece al género *Eugerres* como un grupo polifilético, ya que incluye descendientes de ancestros distintos, lo que refuta la hipótesis planteada en un inicio sobre la monofilia de *Eugerres*. Lo anterior, se debe al hecho de que las topologías resultantes de los análisis de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, muestran que el componente dulceacuícola del género *Eugerres* tiene un origen independiente al de aquellas especies con distribución en ambientes marino-estuarinos. Así también, a partir de este estudio se considera al género *Eugerres* como un grupo parafilético, ya que en los análisis no se incluyó a la especie *E. brevimanus* debido a la dificultad para su recolecta en sus áreas de distribución conocida.

En estudios previos sobre el género *Eugerres*, González-Acosta (2005) y Miranda-Marín (2011) encontraron que existen diferencias morfológicas y morfométricas notables entre los miembros del componente dulceacuícola y de aquél compuesto por las especies de afinidad marino-estuarina; tal situación coincide con la separación filogenética observada en el análisis de tipo cladista desarrollado por González-Acosta (2005). Del mismo modo, los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten corroborar la diferenciación morfológica previamente establecida entre ambos conjuntos ícticos y suponer que éstas diferencias podrían ser consecuencia de un origen evolutivo independiente entre ambos componentes; tal como se observa en los resultados obtenidos de los tres métodos de inferencia filogenética aplicados (Figuras 4, 5 y 6). En estudios como el de Castro-Aguirre *et al.* (1999), ya se insinuaba la posibilidad de tratar al componente dulceacuícola como una entidad genérica distinta de *Eugerres*, bajo el argumento de la presencia de características distintivas muy peculiares y por su patrón de distribución dulceacuícola; al respecto se recomienda la lectura de los estudios de González-Acosta *et al.* (2007a) y González-Acosta y Rodiles-Hernández (2013) para una mejor comprensión acerca de las características que distinguen al conjunto dulceacuícola. Con base en lo anterior y con fundamento en la distancia genética estimada entre el componente

dulceacuícola y el marino-estuario de *Eugerres* (20.1%), se corrobora la posibilidad de incluir al componente dulceacuícola como parte de una categoría genérica distinta a la que actualmente se encuentra asignada. Lo anterior se postula ante la similitud en el porcentaje de diferenciación genética hallado entre *Diapterus* (género hermano de *Eugerres*) y el componente marino-estuarino de *Eugerres* (21.4%), lo que permite suponer que el conjunto de especies de *Eugerres* con distribución en agua dulce pudiera ser tratado como género hermano de *Eugerres* spp. con distribución marino-estuarina.

A partir de lo anterior, se sugiere que el conjunto dulceacuícola formado por *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei*, si bien, comparte un ancestro que habitaba en ambientes de tipo marino estuarino, éste pudo haber dado origen a las formas limnéticas a través de procesos de especiación vicariante que pudieron suceder en estrecha relación con la evolución geotectónica de la cuenca de su distribución actual, eventos que quizá tuvieron lugar después de la última emersión del istmo centroamericano (3.5 millones de años) y, en particular, de la última elevación del Istmo de Tehuantepec (1.5 m.a.). Los cambios en la morfología de la zona causaron fragmentación de biotas ancestrales, las cuales se diversificaron provocando especiaciones de tipo alopátrica, como la que se sugiere para el conjunto de especies vicarias formado por *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei* (González-Acosta, 2005; González-Acosta y Rodiles-Hernandez, 2013). La adaptación del gerréido ancestral que dio origen al conjunto dulceacuícola, posiblemente estuvo en estrecha relación con la gran capacidad osmorregulatoria que caracteriza a los gerréidos, y que les ha permitido vivir de forma exitosa en los ambientes marino-estuarinos (Castro-Aguirre et al., 1994). De este modo se establece que el conjunto de procesos de aislamiento geográfico, así como la adaptación de este conjunto de especies a las condiciones propias de ambientes dulceacuícolas y el origen evolutivo independiente de ambos componentes, pudieron haber sido las principales causas de su diferenciación morfológica (Miranda-Marín, 2011; Miranda-Marín y González-Acosta et al., 2012).

La idea sobre la posibilidad de que una forma ancestral de *E. plumieri* (especie con distribución en la vertiente del Atlántico occidental) pudiera haber dado origen al ancestro que a su vez dio origen al grupo de especies dulceacuícolas de la familia

Gerreidae, fue planteada por González-Acosta (2005) con base en la reconstrucción filogenética del género *Eugerres*. Dicho autor argumenta que el origen de este conjunto específico se encuentra en estrecha relación con la evolución geomorfológica de la llanura costera del Golfo de México, sitio donde se encuentra la provincia del Usumacinta y de distribución actual de las especies dulceacuícolas antes mencionadas; la cual, estuvo asociada al desarrollo de llanuras aluviales y deposición fluvio-déltica de los ríos Grijalva y Usumacinta e influenciadas por variaciones pleistocénicas en el nivel medio del mar. A pesar de lo anterior, la evidencia sustentada en que *Eugerres* no es un grupo monofilético (Figuras 4, 5 y 6) contrasta con la hipótesis sobre el origen del conjunto dulceacuícola a partir de *E. plumieri*.

La topología del cladograma resultante del análisis de Máxima Pasimonia, sin incluir al componente dulceacuícola de *Eugerres* sugiere que si solo se consideran a las especies de afinidad marino-estuarina como parte del grupo interno, podría establecer la condición monofilética del género *Eugerres*. Hecho que robustece la idea de incluir al conjunto formado por *E. castroaguirrei* y *E. mexicanus*, dentro de una nueva categoría a nivel supraespecífico; sin embargo, esta propuesta deberá ser evaluada de manera detallada y publicada formalmente para que tenga validez taxonómica de acuerdo a los estándares establecidos en el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1999).

Con relación a las hipótesis derivadas del análisis de Máxima Verosimilitud y de Inferencia Bayesiana, sin incluir a las especies de *Eugerres* con distribución dulceacuícola, éstas presentaron fuertes inconsistencias debidas a la falta de congruencia en las agrupaciones generadas y filogenias no resueltas, en contraste con la topología obtenida en los análisis donde se incluyó al componente dulceacuícola de *Eugerres*. Estas inconsistencias pueden deberse a una pérdida de resolución a causa de la reducción en el número de taxa dentro del análisis y por tanto la pérdida de información. De este modo, se sugiere para estudios ulteriores la inclusión de las especies dulceacuícolas del género para optimizar las hipótesis filogenéticas que se generen para este grupo.

El análisis de las ramas terminales de los cladogramas obtenidos (clado F, Figuras 4, 5 y 6), corroboran, aunque con soportes bajos de bootstrap y de probabilidad,

la posible relación filética entre las especies del género *Eugerres* con distribución en la vertiente del Atlántico occidental [*E. awlae* + *E. plumieri*] + *E. brasilianus*] y aquellas con distribución en el Pacífico oriental [*E. axillaris* + *E. lineatus*]. De acuerdo con lo establecido por González-Acosta (2005), los procesos que dieron origen a estos conjuntos específicos podrían estar en estrecha relación con eventos de especiación vicariante promovidos por la última emergencia del istmo centroamericano (3.5 m.a), que quizá permitió en un principio la migración del ancestro de dichos conjuntos entre las cuencas del océano Atlántico y Pacífico de América, hasta la última emergencia del istmo centroamericano hace aproximadamente 3.5 millones de años, que interrumpió dicha comunicación y provocó la diversificación de estas especies (González-Acosta, 2005).

La formación de clados a través de ramas terminales, como es el caso de las especies *E. awlae* y *E. plumieri* (Figura 4, 5 y 6), son indicio de su cercanía evolutiva y de su posible condición como especies hermanas. Tal relación, había sido previamente señalada por González-Acosta (2005) en su esquema de clasificación filogenética; asimismo, concuerda con la realización evolutiva de estas especies establecida por Miranda-Marín (2011) y Miranda-Marín y González-Acosta (2012) por medio de criterios morfométricos y, que de acuerdo con la evidencia molecular aquí expresada, podría ser reflejo de su gran similitud genética y cercanía evolutiva (Figuras 4, 5, 6 y 7; Tabla II).

De acuerdo al clado formado por *E. lineatus* y *E. axillaris*, se establece que dichas especies presentan una condición de estrecha relación evolutiva como especies hermanas (nodo G en la Figura 4, 5 y 6), lo que podría ser consecuencia de un proceso similar al mencionado en párrafos arriba; no obstante, deberá tomarse con cautela este aserto hasta no corroborar la topología que podría obtenerse con la inclusión de *E. brevimanus*, especie con distribución en el Pacífico oriental.

E. awlae, *E. axillaris*, *E. brasilianus*, *E. lineatus*, *E. plumieri*, *Diapterus brevirostris*, *Gerres cinereus* y *Eucinostomus currani* fueron las especies que se agruparon en clados terminales independientes, lo que permite corroborar su identidad taxonómica. Aunado a lo anterior, su porcentaje de diferenciación genética interespecífica fue mayor al 2%; porcentaje de diferenciación establecido por Steinke

et al. (2009), Ward *et al.* (2005) y Hebert *et al.* (2003) para proponer a dos entidades específicas distintas. *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei* resultaron ser una misma especie de acuerdo a la evidencia de que conforman un solo linaje (Figuras 4, 5 y 6) y a la de presentar nulidad en la distancia genética que pudiera separar a estas dos especies (Figura 7, Tabla II). Este hecho puede explicarse bajo los siguientes esquemas:

El origen relativamente reciente de *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei* y su distribución simpátrida, permite suponer, que el aislamiento reproductivo entre dichas especies esté aún en proceso, y por ello, no sea posible detectar algún rasgo de diferenciación genética entre ellas.

Es posible también suponer que el marcador mitocondrial utilizado (COI) no tenga la suficiente resolución como para diferenciar a nivel de especies con un corto tiempo de separación, tal como ha sido reportado por Herbert *et al.* (2003) y Ward y Holmes (2007). En el caso de Ward y Holmes (2007), quienes identificaron a un total 388 especies de peces, con excepción de *Urolophus cruciatus* y *U. sufflavus*; dichos autores explican que la reciente historia evolutiva entre estas especies, como podría ser el caso de *Eugerres mexicanus* y *E. castroaguirrei* no permite establecer una diferenciación taxonómica entre ambas. Por consiguiente sugieren realizar estudios genéticos adicionales que preferiblemente incluyan análisis de ADN nuclear, para poder determinar si realmente existe un aislamiento reproductivo entre estas especies. Se recomienda entonces para el caso que nos ocupa, incluir otro tipo de marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares, con el fin de evaluar si es la resolución del marcador lo que interfiere en la determinación de las diferenciaciones genéticas entre estas especies.

La diferenciación genética nula entre *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei*, también podría deberse a que la especie *E. castroaguirrei* constituya un ecotipo de *E. mexicanus*, el cual resulte de la influencia de las características hidrológicas de su zona de distribución, que abarca en su mayoría la parte alta del sistema de ríos Grijalva-Usumacinta, la cual contrasta con la hidrografía de las zonas bajas y cercanas a la desembocadura de ríos donde es común la presencia de *E. mexicanus*.

Los esquemas mencionados en el presente estudio, deben ser tratados como preliminares, ya que una conclusión como las establecidas deben estar sustentadas en análisis detallados que incluyan un muestreo sistematizado a lo largo de la zona de distribución de estas dos especies y la utilización de un mayor número marcadores moleculares que permitan corroborar la posible interrupción de flujo genético entre *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei*.

CONCLUSIONES

La estructura en los cladogramas obtenidos con los métodos de inferencia filogenética utilizados, permite establecer que el género *Eugerres* presenta un origen parafilético-polifilético, lo que contrasta con la hipótesis planteada en un inicio para el presente estudio.

Se corrobora la hipótesis que denota la posible relación filética entre las especies de distribución en la vertiente costera del Atlántico occidental (*E. awlae*, *E. brasilianus* y *E. plumieri*) y las de distribución en el Pacífico oriental (*E. axillaris* y *E. lineatus*).

La evidencia molecular y los métodos de reconstrucción filogenética empleados, permiten establecer que el componente dulceacuícola conformado por "*E.*" *castroaguirrei* y "*E.*" *mexicanus*, manifiesta un linaje independiente al de *Eugerres* spp. con afinidad marino-estuarina. Lo que sustenta la idea de ubicarlo en una entidad supraespecífica diferente a la cual son asignados en la actualidad.

Se establece con base en su cercanía evolutiva la fraternidad entre *E. awlae* y a *E. plumieri*, especies con distribución en el Atlántico occidental.

Los linajes representados por los clados terminales y los análisis de distancias genéticas, permitieron corroborar la identidad taxonómica de la mayoría de las especies tratadas, con excepción de *E. mexicanus* y *E. castroaguirrei*, especies para las que no hubo evidencia de diferenciación genética por lo menos en términos del COI.

LITERATURA CITADA

- Abou-Seedo, F. S. 1993. An experimental study of the role of the caudal fin in the swimming performance of the tropical fish Eucinostomus lefroyi. *Cybium*. 17(3): 181-185.
- Aguirre-León A. & Yáñez-Arancibia 1984. Las mojaras de la laguna de Términos: Taxonomía, biología ecología y dinámica trófica. (Pisces: Gerreidae). *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*. 13: 369-444.
- Aguirre-León & Díaz-Ruiz. 2000. Estructura poblacional, madurez gonádica y alimentación de Eugerres plumieri (Gerreidae) en el sistema fluvio-deltaico Pom-Atasta, México. *Cienc. Mar*. 26(2): 253-273.
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*. 19 (6): 716-723
- Álvarez-Pliego N. 2004. *Desarrollo osteológico de Diapterus peruvianus (Cuvier, 1830) (Percoidei:Gerreidae)*. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 80 p.
- Álvarez-Pliego N. 2009. *Análisis filogenético y biogeográfico de los peces del género Diapterus Ranzani, 1842 (Percoidei:Gerreidae)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México 129 p.
- Andreatta J. V. 2011. Validation of the genus Eugerres Jordan y Evermann, 1927 (Teleostei, Perciformes, Gerreidae). *Rev Bras Zooc*. 13 (1, 2, 3): 147-150.
- Araujo, F. G. & A. C. De Alcántara-Santos. 1999. Distribution and recruitment of mojaras (Perciformes: Gerreidae) in the continental margin of Sepetiba Bay. Brazil. *Cienc. Mar*. 65(2): 431-440.
- Benítez-Cortés O. 2004. *Contribución al estudio de la filogenia molecular de los peces de la familia Gerreidae en México*. Tesis de Maestría en Ciencias Marinas. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 55 p.
- Burnes-Romo L. 2009. *Estatus taxonómico de Gerres cinereus (Walbaum, 1792), (Teleostei:Gerreidae)*. Tesis de Maestría en Ciencias Marinas. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 89 p.

- Bussing W. A. 1995. Gerreidae: mojarras, 1114-1128. En: Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter & V. H. Niem (comps.) *Guía para la identificación de especies para los fines de pesca, Pacífico Centro-Oriental. Vol. II, Vertebrados-Parte 1*. FAO. Roma, Italia.
- Castro-Aguirre J. L. 1978. Catálogo sistemático de los peces marinos que penetran a las aguas continentales de México, con aspectos zoogeográficos y ecológicos. *Serie Cient. No. 19, INP-Depto. de Pesca*. México. 298p.
- Castro-Aguirre J. L., F. Balart & J. Arvizu-Martínez. 1994. Consideraciones generales sobre la ictiofauna de las lagunas costeras de México. *Rev. Zool. Inf.* 27: 47-84.
- Castro-Aguirre J. L., H. S. Espinosa-Pérez & J. J. Schmitter-Soto. 1999. *Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México*. Editorial Limusa-Noriega. México. 711 p.
- Chakraborty A., M. N. Venugopal, K. Hidaka & Y. Iwatsuki. 2005. Genetic differentiation between two color morph of Gerres erythrourus (Perciformes: Gerreidae) from the Indo Pacific region. *Ichthyol. Res.* 53: 185-188.
- Chen W. J., R. R. Ruiz-Carus & G. Orti. 2007. Relationship among four genera of mojarras (Teleostei: Perciformes: Gerreidae) from the western Atlantic and their tentative placement among Percomorph fishes. *J. Fish Biol.* 70: 202-218.
- Chollet-Villalpando J.G. 2012. *El hueso urohial en la familia Gerreidae (Teleostei: Perciformes): Análisis taxonómico y filogenético*. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 83 p.
- Curran H. W. 1942. *A systematic revision of the gerrid fishes referred to the genus Eucinostomus with a discussion of the distribution and speciation*. Tesis de doctorado. Universidad de Michigan. E. U. A. 183 p.
- Cyrus D. P. & S. J. M. Blaber. 1983. The food and feeding ecology of Gerreidae Bleeker 1859, in the estuaries of Natal. *FSBI.* 22:373-393.
- De la Cruz-Agüero J. C. & F. Galván, 1993. Morphological discrimination of Eucinostomus spp. from the Pacific coast of Mexico. *B. Mar. Sci.* 52(2): 819-824.

- De la Cruz-Agüero J. 2001. *Sistemática y biogeografía de las especies del género Eucinostomus (Teleostei: Gerreidae)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 181 p.
- De la Cruz-Agüero J., F. J. García-Rodríguez, V. M. Cota Gómez, J. G. Chollet Villalpando & F. J. Vergara Solana. 2011. Length-Weight relations of selected species of the family Gerreidae (Actinopterygii: Perciformes) from the Mexican coast. *Acta Ichthyol. Piscat.* 41(1): 67-69.
- Deckert G. D. 1973. *A systematic revision of the genera Diapterus and Eugerres: with the description of a new genus Schizopterus (Pisces: Gerreidae)*. Thesis of Master Science. Northern Illinois University. 74p.
- Deckert G. D. & D. W. Greenfield. 1987. A review of the western Atlantic species of the genera Diapterus and Eugerres (Pisces: Gerreidae). *Copeia* 1987 (1): 182-194.
- Eschmeyer W. N. & J. D. Fong. 2013. *Species by Family/Subfamily*: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Fecha de acceso: febrero de 2013.
- Farias I. P., G. Ortí & A. Meyer. 2000. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetic of Chichil fishes. *J. Exp. Zool.* 288: 76-92.
- Gilmore R. G. Jr. y D. W. Greenfield, 2002. Gerreidae: Mojarra. P 1506-1521. En: K. E. Carpenter (ed.). *The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volumen 3: Bony fish part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals*. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No. 5. Roma. 2002. 1375-2127 p.
- Gleason L. U., H. J. Walker, P. A. Hatings & R. S. Burton. 2009. *Establishing a DNA sequence database for the marine fish fauna of California*. Calif. Sea Grant College Program. University of California. E.U. A. Datos no publicados.
- Goloboff, P.A., J.S. Farris & K.C. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. 24: 774-786.
- González-Acosta A. F. 2005. *Estudio sistemático y biogeográfico del género Eugerres (Perciformes: Gerreidae)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México. 207 p.

- González-Acosta A. F., J. De la Cruz-Agüero & J. L. Castro-Aguirre. 2005. A review of eastern Pacific species of the genus Eugerres (Perciformes: Gerreidae). *B. Mar. Sci.* 76(3):661-673.
- González-Acosta A. F., J. De la Cruz-Agüero & J. L. Castro-Aguirre. 2007a. A review of the marine Western Atlantic species of genus Eugerres (PERCIFORMES: Gerreidae). *B. Mar. Sci.* 80(1):109-124.
- González-Acosta A. F., P. Béarez, N. Álvarez-Pliego, J. De la Cruz-Agüero & J. L. Castro-Aguirre. 2007b. On the taxonomic status of Diapterus peruvianus (Cuvier, 1830) and reinstatement of Diapterus brevirostris (Sauvage, 1879). *Cybium*. 31(3): 369-377.
- González-Acosta A.F. & R. Rodiles-Hernández. 2013. New species of *Eugerres* from the Usumacinta Province, México and Guatemala with a redescription of E. mexicanus (Steindachner, 1863) (Teleostei:Gerreidae). *Neotrop. Ichthyol.* 11(2): 307-318.
- Greenfield D. W. & J. E. Thomerson. 1997. *Fishes of the continental waters of Belize*. Gainesville. The Univ. Press of Florida. 311p.
- Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acid. S.* 41: 95-98.
- Hebert P.D.N., S. Ratnasingham & J.R. de Ward. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *P. R. Soc. London.* 270. S96–S99-
- Huelsenbeck J. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics.* 17: 754-755.
- ICZN, 1999. *International Code of Zoological Nomenclature*. 4th Ed. London, The International Trust for Zoological Nomenclature.
- Ivanova N. & C. Graninger, 2006. *Protocols COI Amplification*. http://www.ccdb.ca/docs/CCDB_Amplification.pdf. Fecha de acceso: septiembre de 2012.
- Johnson G.D. 1980. Percoidei: Development and Relationships, 464-498. En: Moser H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr. & S.L.

- Richardson (Eds). *Ontogeny and Systematics of fishes*. Am. Assoc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub. 1. U.S.A. 760p.
- Kobelkowsky A. 2004. Osteología de la mojarra de mar, Diapterus auratus Ranzani (Teleostei:Gerreidae). *Hidrobiológica*. 14 (1): 1-10.
- Lemos P. H., M. F. Maia-Corréa & V. Abilhóa. 1992/93. Catálogo de otolitos de Gerreidae (Osteichthyes-Perciformes) do litoral do estado do Paraná, Brasil. *Nerítica*. 7: 109-117.
- Llorente-Bousquets J. & S. Ocegueda. 2008. Estado del conocimiento de la biota, 283-322. En: *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio. México. http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I11_Estadococimiento.pdf. Fecha de acceso: mayo de 2013.
- Matheson, Jr. R. E. & J. D. McEachran. 1984. Taxonomic studies of the Eucinostomus argenteus complex (Pisces:Gerreidae): Preliminary Studies of external morphology. *Copeia*. (4): 893-902.
- McEachran J. D. & J. D. Fechhelm. 2005. *Fishes of the Gulf of Mexico. Vol 2. Scorpaeniformes to Tetraodontiformes*. Austin, University of Texas Press. 344-346.
- Miranda-Marín M. I. 2011. *Inferencias Filogenéticas del género Eugerres Jordan y Evermann, 1927, mediante la aplicación de morfometría geométrica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 65 p.
- Miranda-Marín M. I. & A. F. González-Acosta. 2012. Inferencias Filogenéticas del género Eugerres Jordan y Evermann, 1927, mediante la aplicación de morfometría geométrica. Capítulo 8. En: Del Moral Flores, L. F., J. A., Martínez-Pérez, J. Franco-López, A. J. Ramírez-Villalobos y J. L. Tello Mus (Ed.). 2012. *Investigación Ictiológica en México. Temas Selectos en Honor al Dr. José Luis Castro Aguirre*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Sociedad Ictiológica Mexicana. México. 304p.
- Morrone J.J. & O.D. Espinosa. 1998. La relevancia de los atlas beogeográficos para la conservación de la biodiversidad mexicana. *Ciencia*. 49: 12-16.

- Morrone J. J. 2000. *El lenguaje de la cladística*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 100p.
- Nelson J.S. 2006. *Fishes of the world*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 601p.
- Oliveira-Ribeiro A., R. Antunes-Caires, T. Casagrande-Mariguela, L. E. García-Pereira, R. Harnner & C. Oliveira. 2012. DNA barcodes identify marine fishes of Sao Paulo State, Brazil. *Mol. Ecol. Resour.* 12(6): 1012-1020.
- Ortiz-Galindo J. L. 2009. *Ontogenia y sistemática filogenética de la Familia Gerreidae (Teleostei:Percoide)*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 139 p.
- Pérez-Hernández M.A. & J.A. Zavala-Hurtado. 1993. Biometry of the Eugerres plumieri - Eugerres brasiliensis (Pisces:Gerreidae) complex from the Gulf of México. A multivariate approach. *Rev. Biol. Trop.* 41(1):121-130.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25 (7): 1253-1256.
- Rambaut A. 2006-2008. *Tree Figure Drawing Tool, Versión 1.1.1*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/>. Fecha de acceso: septiembre 2012.
- Rambaut A. & A. J. Drummond. 2007. *Tracer Versión 1.4*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>. Fecha de acceso: septiembre 2012.
- Rivas A., E. Méndez, L. Ruiz, A. Torres & L. Martínez. 1999. Hábitos alimenticios de Eucinostomus gula y E. argenteus (Pisces: Gerreidae) en la bahía Mochima, Estado Sucre, Venezuela. *B. Inst. Ocea. Ven. Univ. Ori.* 38(2): 91-98.
- Roa-Varón A. y G. Ortí. 2009. Phylogenetic relationships among families of Gadiformes (Teleostei: Paracanthopterygii) based on nuclear and mitochondrial data. *Molecul. Phylogenet. Evol.* 52: 688-704.
- Rodríguez-Romero J., D.S. Palacios-Salgado & E. E. de la Vega-Meza. 2008. Record size of yellow fin mojarra Gerres cinereus (Percoidei:Gerreidae) off the west coast of the Baja California Peninsula. *Mar. Biodiver. Rec.* 2: 1-2.
- Ruíz-Carus R. y M. Uribe-Alcocer. 2003. Phylogenetic assessment of Eucinostomus gula, Eugerres plumieri, and Diapterus auratus (Pisces:Gerreidae) based on allozyme and mtDNA analyses. *Caribb J Sci.* 39(1):109-115.

- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 22 (21): 2688-2690.
- Steinke D., T.S. Zemlak, J.A. Boutiller y P.D.N. Hebert. 2009. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar Biol*. 156: 2641-2647.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731-2739.
- Tavaré S. 1986. *Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Some Mathematical Questions in Biology DNA. Sequences Analysis*. Lectures on Mathematics in the Life Sciences. Volúmen 17. 57-86.
- Thompson J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22(22): 4673-4680.
- Valdez-Zenil J., R. Rodiles-Hernández, A. F. González-Acosta, M. Mendoza Carranza y E. Barba-Macías. 2014. Length-weight and length-length relationships, gonadosomatic indices and size at first maturity of Eugerres mexicanus (Steindacher, 1863) (Percoidae: Gerreidae) from the Usumacinta River, México. *J Appl Ichthyol*. 30(1): 218-220.
- Vergara-Solana F.J. 2012. *Sistemática del género Diapterus Ranzani, 1842 (Perciformes: Gerreidae): Análisis morfométricos y moleculares*. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. La Paz, B. C. S. México. 112 pp.
- Ward R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last y P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. 2005. *Philos T R Soc B*. 360: 1847-1857.
- Ward R. D. y B.H. Holmes. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Mol. Biol. Not.* 7: 899-907.

Wiley E.O. y B.S. Lieberman. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics, Second Edition*. Wiley-Blackwell. U.S.A. 406 pp.

ANEXOS

Anexo 1. Datos de identificación, recolecta y colección de depósito de los ejemplares recolectados (*Diapterus brevisrostris*, *Eugerres awlae*, *Eugerres axillaris*, *Eugerres castroaguirrei*, *Eugerres lineatus*, *Eugerres mexicanus*, *Eugerres plumieri* y *Gerres cinereus*) y de aquellos depositados en el Sistema de Códigos de Barras de la Vida (*Eugerres brasilianus* y *Eucinostomus currani*).

Especie	Colección de depósito	Número de catálogo	ID de la muestra de tejido	Localidad de colecta	Latitud (Coordena da G.g)	Longitud (Coordena da G.g)	Fecha de colecta	Colectó	Identificó
<i>Eugerres awlae</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eaw24	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Agosto/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres awlae</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eaw25	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres awlae</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eaw26	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres awlae</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eaw27	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres awlae</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eaw03	Boca del Río, Ver.	19.099	-96.097	13/08/2008	AFGA	AFGA
<i>Eugerres awlae</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eaw02	Boca del Río, Ver.	19.099	-96.097	13/08/2008	AFGA	AFGA
<i>Eugerres plumieri</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Epl13	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA

<i>Eugerres plumieri</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Epl10	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres plumieri</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Epl12	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres plumieri</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Epl11	Río Hondo, Chetumal, Qro.	18.486	-88.247	Junio/2012	JLV	AFGA
<i>Eugerres brasiliaus</i>	Universidade Estadual Paulista, Lab de Biología y Genética de Peces	46900	Ebra 46900	Sao Paulo, Brasil	-24.616	-46.133	13/09/2010	CO	CO
<i>Eugerres brasiliaus</i>	Universidade Estadual Paulista, Lab de Biología y Genética de Peces	46896	Ebra 46896	Sao Paulo, Brasil	-24.616	-46.133	13/09/2010	CO	CO
<i>Eugerres brasiliaus</i>	Universidade Estadual Paulista, Lab de Biología y Genética de Peces	46897	Ebra 46897	Sao Paulo, Brasil	-24.616	-46.133	13/09/2010	CO	CO
<i>Eugerres brasiliaus</i>	Universidade Estadual Paulista, Lab de Biología y Genética de Peces	46898	Ebra 46898	Sao Paulo, Brasil	-24.616	-46.133	13/09/2010	CO	CO

	Paulista, Lab de Biología y Genética de Peces								
<i>Eugerres brasiliaus</i>	Universidade Estadual Paulista, Lab de Biología y Genética de Peces	46899	Ebra 46899	Sao Paulo, Brasil	-24.616	-46.133	13/09/2010	CO	CO
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli23	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli22	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli21	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli20	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli14	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli12	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli09	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Eli12	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM

<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eli11	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eli14	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CICIMAR-IPN	CICIMAR-s/n	Eli10	La Paz, B.C.S.	24.166	-110.416	Marzo/2012	MIMM	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CNPE-IBUNAM	CNPE-IBUNAM s/n	Eli Epl29	ND	ND	ND	Octubre/2012	ND	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CNPE-IBUNAM	CNPE-IBUNAM s/n	Eli Epl28	ND	ND	ND	Octubre/2012	ND	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CNPE-IBUNAM	CNPE-IBUNAM s/n	Eli Epl27	ND	ND	ND	Octubre/2012	ND	MIMM
<i>Eugerres lineatus</i>	CNPE-IBUNAM	CNPE-IBUNAM s/n	Eli Epl26	ND	ND	ND	Octubre/2012	ND	MIMM
<i>Eugerres axillaris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR-SCs/n	Eax01	Sistema Lagunar Chantuto-Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	19/08/2011	ND	MIMM
<i>Eugerres axillaris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR-SCs/n	Eax02	Sistema Lagunar Chantuto-Panzacola,	15.166	-92.833	Septiembre/2011	ND	MIMM

				Acapetahua, Chiapas					
<i>Eugerres axillaris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Eax ECO23	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	Septiembre/20 11	ND	MIMM
<i>Eugerres axillaris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Eax06	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	Septiembre/20 11	ND	MIMM
<i>Eugerres axillaris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Eax04	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	Septiembre/20 11	ND	MIMM
<i>Eugerres axillaris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Eax03	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	Septiembre/20 11	ND	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff09	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff07	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM

<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff06	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff03	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff01	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff05	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff04	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres castroaguirrei</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Emaff02	Río Lacantún, Chiapas	16.25	-90.85	05/05/2012	BH	MIMM
<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em07	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM
<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em06	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM
<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em03	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM
<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em02	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM

<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em08	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM
<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em05	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM
<i>Eugerres mexicanus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Em04	Río Usumacinta, Tenosique, Tabasco	17.483	-91.45	12/05/2012	EGP	MIMM
<i>Diapterus brevirostris</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Dbr02	Mulegé, B.C.S.	26.866	-111.9	19/01/2012	AFGA	MIMM
<i>Diapterus brevirostris</i>	CICIMAR- IPN	CICIMAR- s/n	Dbr01	Mulegé, B.C.S.	26.866	-111.9	19/01/2012	AFGA	MIMM
<i>Diapterus brevirostris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Dbr ECO11	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	17/08/2011	ND	MIMM
<i>Diapterus brevirostris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Dbr ECO10	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	17/08/2011	ND	MIMM
<i>Diapterus brevirostris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Dbr ECO09	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola,	15.166	-92.833	17/08/2011	ND	MIMM

				Acapetahua, Chiapas					
<i>Diapterus brevirostris</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Dbr ECO08	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	17/08/2011	ND	MIMM
<i>Eucinostomu s currani</i>	Mined from GenBank, NCBI	SIO 09-154	Euci154	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Eucinostomu s currani</i>	Mined from GenBank, NCBI	SIO 00-142	Euci125	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Gerres cinereus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Gc ECO04	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	12/08/2011	ND	MIMM
<i>Gerres cinereus</i>	ECOSUR-SC	ECOSUR- SCs/n	Gc ECO03	Sistema Lagunar Chantuto- Panzacola, Acapetahua, Chiapas	15.166	-92.833	12/08/2011	ND	MIMM

Acrónimos utilizados en nombres de colector e identificador: Adrián Felipe González Acosta (AFGA); Benjamín Hernández (BH); Claudio Oliveira (CO); Eleuterio García Parra (EGP); Jesús López Vila; María Isabel Miranda Marín (MIMM).

Anexo 2. Procedimiento seguido para la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo

1. Desinfectar el área de trabajo y limpiar los utensilios (tijeras y pinzas) primero con jabón y después con etanol. Dar la última limpieza con un trapo bañado en alcohol.
2. Rotular tres series de tubos de eppendorf de 1.5 ml.
3. Agregar 700 μ L de buffer de extracción a la primer serie de tubos, un fragmento de muestra de aproximadamente 1cm³ y 7 μ L de proteinasa K.
4. Dejar incubando a 56°C con agitación durante toda la noche
 - a. Verificar que el tejido no quede pegado al tubo, para ello es importante mezclar.
5. En los tubos con muestras agregar 250 μ L de fenol y 250 μ L del cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Agitar bien y centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm.
6. Trasladar el sobrenadante a la segunda serie de tubos rotulados y añadir 500 μ L de cloroformo, agitar bien y centrifugar 10 minutos a 13200 rpm.
7. Trasladar el sobrenadante a la tercera serie de tubos rotulados y añadir 700 μ L de alcohol frío (100%). Dejar precipitar durante la noche a 4°C.
8. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm de preferencia a 4°C en una centrífuga refrigerada. Decantar el alcohol o dejarlo secar utilizando una pipeta de 200 μ L, teniendo cuidado de no llevarse el botón de ADN. Añadir a cada tubo 700 μ L de etanol al 70% frío. Volver a centrifugar 10 minutos a la misma velocidad.
9. Decantar de nuevo el alcohol o secarlo utilizando una pipeta de 200 μ L, teniendo cuidado de no llevarse el botón de ADN. Secar el precipitado en la centrífuga con vacío y dejar secando los tubos abiertos en una caja con tapa, de un día para otro.
10. Resuspender en 200 μ L de agua bidestilada estéril.
11. Correr un gel al 1% para confirmar la presencia de ADN*.
12. Cuantificar el ADN y dejarlo en 50 ng.

*Para preparar el gel agregar 40 ml de TBE (0.5 X) en un matraz de 250ml y agregar 0.4 g de agarosa. Para disolverlo es necesario poner el matraz por 10 segundos al microondas y repetir la operación hasta que quede completamente disuelto. Agregar 0.5 μ L de Gel Red Nucleic Acid y poner la solución en una cámara con pocitos hasta que solidifique. Poner en los pocitos del gel 4 μ L de muestra-LB (2 μ L de muestra + 2 μ L de LB previamente mezclados en un cuadro de parafina), rellenar la cámara de electroforesis con TBE y cerrar la cámara con los polos conectados (+ -) a 115 V durante 15 minutos. Colocar el gel en una cámara con luz ultravioleta y la presencia de bandas corroborarán la presencia de ADN.

Anexo 3. Protocolo del Centro Canadiense para la Amplificación del Código de Barras de la Vida (citocromo c oxidasa subunidad 1), desarrollado por Ivanova y Grainger (2006).



Taq polymerase choice

High DNA barcoding production rates demand high success in amplification of the barcode region. One particularly critical element for PCR amplification is the polymerase enzyme. During the testing of DNA barcoding protocols across a broad range of taxonomic groups, from insects to mammals, it was clear that one higher-cost polymerase from Invitrogen™ (Platinum® Taq DNA Polymerase) delivered both greater intensity amplicons and amplification success in cases where standard Taq failed. Results indicated that Platinum® Taq offers the highest performance, and it is now the standard PCR enzyme used by the CCDB. Platinum® Taq also offers a number of benefits over standard Taq polymerases. It is a robust enzyme that needs less optimization compared to standard Taq. As Platinum® Taq requires a "hot start" for activation, there is less enzyme breakdown and fewer non-specific PCR amplicons. Platinum® Taq is also stable at room temperature, allowing for advanced preparation and storage of PCR plates for future use.

Addition of trehalose facilitates PCR and makes possible freezing of aliquoted master-mixes. Currently CCDB uses batch strategy for making PCR plates. Mixes are aliquoted directly into 96-well plates, using Biomek® FX robot, plates are covered with PCR film and stored at -20°C for up to 3 months. Each batch is labeled, recorded in the system and tested to assure performance. The combination of a thermostable Platinum® Taq with trehalose ensures high performance even after multiple freeze-thaws. Results with regular Taq polymerases may be less satisfactory.

Aliquots in tubes can be stored at -20°C for up to 3 months (1-3 freeze-thaw cycles don't affect performance). The content of a tube should be mixed by pipetting before use.

Consumables & Equipment for PCR amplification

- 10% trehalose: dissolve of 5 g D-(+)-trehalose dehydrate (Sigma, 90210), in 50 ml of total volume of molecular grade ddH₂O. Store at -20°C.
- 10X PCR Buffer for Platinum Taq (Invitrogen™). Store at -20°C.
- 50 mM MgCl₂ (Invitrogen™). Store at -20°C.
- 10 mM dNTP mix (New England Biolabs®). Store at -20°C in 100 µl aliquots.
- 100 µM primer stock: dissolve desiccated primer (Invitrogen™) in ___ number of nmol x 10 µl ultrapure H₂O. Store at -20°C.

- 10 µM primer working solution: add 20 µl of 100 µM primer stock to 180 µl of molecular grade ddH₂O. Store at -20°C.
- Platinum Taq polymerase (Invitrogen™). Store at -20°C in 50 µl aliquots.
- Microplate (Eppendorf® plates).
- Cap strips (ABgene®) or Aluminum sealing film.
- Thermocycler (Mastercycler® ep gradient, Eppendorf®).

Basic recipe for Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR reagents per 12.5 µl reaction:

# of reactions	1	100
10% trehalose	6.25 µl	625 µl
ddH ₂ O	2 µl	200 µl
10X buffer	1.25 µl	125 µl
50 mM MgCl ₂	0.625 µl	62.5 µl
10 µM primer A	0.125 µl	12.5 µl
10 µM primer B	0.125 µl	12.5 µl
10 mM dNTPs	0.0625 µl	6.25 µl
Polymerase (5 U/µl)	0.06 µl	6 µl
Total	10.5 µl	1050 µl
DNA template	2 µl per well	

Aliquot 1/8 of total mix volume in 8-tube PCR strip (if making more than one plate, pour mix into disposable container) and dispense desired volume (10.5 µl for 12.5 µl reactions) in 96-well plate and then add 1-2 µl of DNA extract. If you plan to fill several 96-well plates include extra volume to allow for pipetting mistakes and dead volume in the digital multichannel pipettor (e.g. for making 10 plates with 12.5 µl reactions each, include about 40 extra reactions).

General recommendations

- The use of filter tips is recommended for all PCR reagents to avoid contamination. Clean the bench top with alcohol before setting up reactions.
- Always use a sterile tip when removing Taq polymerase and the other reagents from their tubes.
- Keep DNA templates (i.e. other PCR products) away from the PCR reagents while you are setting up the reaction mixes. Add DNA after all of the reagents have been returned to the freezer.
- Always include a sample without template as a negative

control to check for contamination of the reagents. Include a positive control (a DNA sample that has amplified in the past) as well to test the effectiveness of the PCR reagents.

Tips for primer design

- Primers should be between 20-30 nt in length.
- Avoid complementarity within and between primers.
- The GC content should be approximately 50%.
- Avoid mono- or dinucleotide repetition within primers.
- The primer should end on a G or a C.
- Primers should end on the second (or first if necessary) position of a codon.
- The melting temperatures of primer pairs should be within 5°C of one another
- To design COI primers for a particular taxonomic group, try aligning as many COI genes from closely related taxa as possible (try surfing GenBank) for the desired species group. Design primers that are situated in regions that are conserved across all taxa.
- Primers could be tailed with M13 tails. However, some tailed versions can form strong primer dimers, reducing PCR efficiency (e.g. LepF1_t1 and LepR1_t1 used in a mammal cocktail, do not work well as stand alone primers).

PCR thermocycle program

Typical conditions for COI amplification include the initial denaturation at 94°C for 1 min, five cycles of 94°C for 30 sec, annealing at 45-50°C for 40 sec, and extension at 72°C for 1 min, followed by 30-35 cycles of 94°C for 30 sec, 51-54°C for 40 sec, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min, followed by indefinite hold at 4°C. Please, refer to original publications listed under primer references for more details on PCR conditions.

PCR product check

Invitrogen E-gel® 96 system and software

We now employ pre-cast agarose gels from Invitrogen™. This system is bufferless, so exposure to Ethidium Bromide is minimized. However, gloves should be worn when handling and loading the gel.

Loading and running E-gel® 96 gels

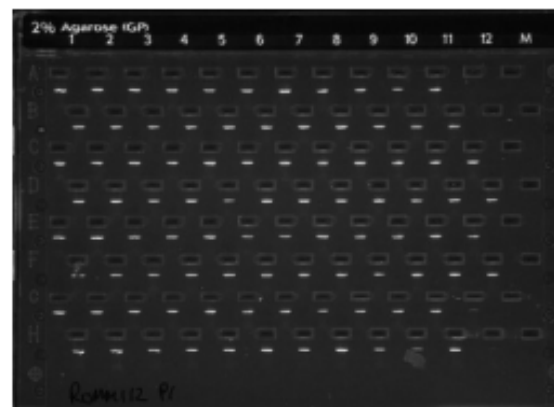
The recommended program for 2% Agarose E-gel® 96 gel is EG and the run time is 6-12 min. Plug the Mother E-Base™ into an electrical outlet. Press and release the pwr/prg (power/program) button on the base to select program EG.

- Remove gel from the package and remove plastic comb from the gel.
- Slide gel into the two electrode connections on the Mother or Daughter E-Base™.

- Load 16 µl of ddH₂O into wells with 8- or 12-multichannel pipettor.
- Load appropriate DNA markers in the marker wells.
- Load 4 µl of sample.
- To begin electrophoresis, press and release the pwr/prg button on the E-Base™. The red light changes to green.
- At the end of run (signaled with a flashing red light and rapid beeping), press and release the pwr/prg button to stop the beeping.
- Remove gel cassette from the base and capture a digital image of a gel on UV transilluminator equipped with digital camera.
- Analyze the image and align or arrange lanes in the image using the E-editor™ 2.0 software available at: <http://www.invitrogen.com/egels/>
- Incorporate E-gel image into lab spreadsheet for estimation of concentration and hit picking.

Typical E-gel image of COI amplification

Mammalian DNA was extracted with Glass Fiber method (refer to DNA extraction section) and amplified with Platinum Taq polymerase using M13-tailed Mammal cocktail (master mix contained 5% trehalose)



White bands indicate product; Square slots are the loading wells; A12, B12 – negative controls

PCR product clean-up

Currently we don't clean-up PCR products and proceed directly to sequencing.

References

- Franks F (1990) Freeze drying: from empiricism to predictability. *Cryoletters*, **11**, 93-110.
- Hajibabaei M, deWaard JR, Ivanova NV et al. (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, **360**, 1959-1967.
- Ivanova N, Grainger C (2006) Pre-made frozen PCR and sequencing plates. *CCDB Advances, Methods Release No. 4*, December 1st, 2006.
- Ivanova N, Grainger C, Hajibabaei M (2006) Increased DNA barcode recovery using Platinum[®] Taq. *CCDB Advances, Methods Release No. 2*, November 3, 2006.
- Ivanova NV, deWaard JR, Hajibabaei M, Hebert PDN (2005) Protocols for high volume DNA barcoding. Draft submission to: DNA working group Consortium for the Barcode of Life. Published online at <http://www.dnabarcoding.ca/>
- Spieß AN, Mueller N, Ivell R (2004) Trehalose is a potent PCR enhancer: Lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of Taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinical Chemistry*, **50**, 1256-1259.

Anexo 4. Número de secuencias genéticas obtenidas a partir de un fragmento de genoma mitocondrial (COI), analizadas por especie del género *Eugerres* y grupos externos. Entre paréntesis, el acrónimo de la especie usado en todos los análisis.

Número de secuencias por especie	
<i>E. awlae</i> (Aaw)	6
<i>E. plumieri</i> (Epl)	4
<i>E. brasilianus</i> (Ebra)	5
<i>E. lineatus</i> (Eli)	13
<i>E. axillaris</i> (Eax)	6
<i>E. castroaguirrei</i> (Emaff)	8
<i>E. mexicanus</i> (Em)	7
<i>Diapterus brevirostris</i> (Dbr)	6
<i>Eucinostomus currani</i> (Euci)	2
<i>Gerres cinereus</i> (Gc)	4
Total de secuencias analizadas	61

Anexo 5. Matriz de las secuencias genéticas (COI) utilizadas para generar los cladogramas a partir de los métodos de Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

#NEXUS

BEGIN DATA;

DIMENSIONS NTAX=61 NCHAR=652;

FORMAT DATATYPE=DNA INTERLEAVE=NO GAP=- MISSING=?;

MATRIX

Eaw24

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTCATA
CCAATCATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCTTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGAGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCTGCAATTACTCAGTACCAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTCCTGCTTCTATCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCGGTATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACAC
CACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Eaw25

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTCATA
CCAATCATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCTTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGAGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCTGCAATTACTCAGTACCAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTCCTGCTTCTATCTCT

TCCTGTTCTGGCCGCCGGTATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACAC
CACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Eaw26

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTAATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTCATA
CCAATCATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCTTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGAGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCTGCAATTACTCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTCCTGCTTCTATCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCCGGTATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACAC
CACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Eaw27

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTCATA
CCAATCATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCTTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGAGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCTGCAATTACTCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTCCTGCTTCTATCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCCGGTATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACAC
CACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Eaw03

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTCATA
CCAATCATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCTTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGAGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCTGCAATTACTCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTCCTGCTTCTATCTCT

TCCTGTTCTGGCCGCCGGTATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACAC
CACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Eaw02

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTCATA
CCAATCATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCTTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGAGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCTGCAATTACTIONCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTCCTGCTTCTATCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCCGGTATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACAC
CACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Epl13

CCTG?AT?T?ATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCTG
CTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAAATT
TATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTTATAACC
AATTATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCCCC
TGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCTCA
TTCCTTCTTCTCCTAGCCTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGGGCCGGAACAGGGTGA
ACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTGAC
CTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAATCA
ACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCAGCAATTACTIONCAGTACCAAACC
CCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTTCTGCTTCTATCTTCC
TGTTCTGGCCGCCGGTACTATGCTCTTAACCGATCGTAACCTAAACACCACC
TTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Epl10

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAAA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATTATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCCTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGGGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCAGCAATTACTIONCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTTCTGCTTCTATCTCTT

CCTGTTCTGGCCGCCGGCATCACTATGCTCTTAACCGATCGTAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Epl12

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAAA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATTATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCCTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGGGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCAGCAATTACTIONCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTTCTGCTTCTATCTCTT
CCTGTTCTGGCCGCCGGCATCACTATGCTCTTAACCGATCGTAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Epl11

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGGACGGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAAA
TTTATAATGTGATCGTCACCGCCCACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATTATGATCGGTGGCTTCGGCAACTGGCTGATCCCGCTAATGATCGGGGCC
CCTGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCCT
CATTCTTCTTCTCCTAGCCTCTTCAGGAGTCGAAGCGGGGGCCGGAACAGGGT
GAACCGTCTATCCCCCTCTGGCAGGCAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATTACAACAATTATTAACATGAAACCTCCAGCAATTACTIONCAGTACCAAA
CCCCACTGTTTGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCTGTGCTTCTGCTTCTATCTCTT
CCTGTTCTGGCCGCCGGCATCACTATGCTCTTAACCGATCGTAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Ebra_46900

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCCGAACTAAGCCAGCCTGGGTCCCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATCATGATTGGTGGCTTTGGAACTGGCTTATTCCGCTGATGATCGGGGCC
CCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCTCCTTC
GTTCTTCTTCTCCTGGCCTCCTCAGGAGTCGAGGCAGGGGGCCGGAACGGGTT
GAACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTGGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTG
ACCTGACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAAT
CAACTTTATCACAACAATTATTAACATGAAACCCCCAGCAATTACTIONCAGTATCAA
CTCCCCCTGTTTGTCTGAGCCGTATTAATTACTIONGCGGTTCTTCTCCTCTTCTCTT

CCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACCATGCTCTTAACCGATCGAAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGAGACCCAATCCTCTACCAACACCTG

Ebra_46896

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGAACTAAGCCAGCCTGGGTCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATCATGATTGGTGGCTTTGGAACTGGCTTATTCCGCTGATGATCGGGGCC
CCTGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCTCCTTC
GTTCTTCTTCTCCTGGCCTCCTCAGGAGTCGAGGCAGGGGCCGGAACGGGTT
GAACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTGGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAAT
CAACTTTATCACAACAATTATTAACATGAAACCCCCAGCAATTACTIONCAGTATCAA
CTCCCCCTGTTTGTCTGAGCCGTATTAATTACTIONGCCGTTCTTCTCCTCCTTTCTCTT
CCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGAGACCCAATCCTCTACCAACACCTG

Ebra_46897

CCTCCATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCGAACTAAGCCAGCCTGGGTCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATCATGATTGGTGGCTTTGGAACTGGCTTATTCCGCTGATGATCGGGGCC
CCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCTCCTTC
GTTCTTCTTCTCCTGGCCTCCTCAGGAGTCGAGGCAGGGGCCGGAACGGGTT
GAACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTGGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTG
ACCTGACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAAT
CAACTTTATCACAACAATTATTAACATGAAACCCCCAGCAATTACTIONCAGTATCAA
CTCCCCCTGTTTGTCTGAGCCGTATTAATTACTIONGCCGTTCTTCTCCTCCTTTCTCTT
CCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACCATGCTCTTAACCGATCGAAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGAGACCCAATCCTCTACCAACACCTG

Ebra_46898

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCTGAACTAAGCCAGCCTGGGTCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATCATGATTGGTGGCTTTGGAACTGGCTTATTCCGCTGATGATCGGGGCC
CCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCTCCTTC
GTTCTTCTTCTCCTGGCCTCCTCAGGAGTCGAGGCAGGGGCCGGAACGGGTT
GAACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTGGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTG
ACCTGACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAAT
CAACTTTATCACAACAATTATTAACATGAAACCCCCAGCAATTACTIONCAGTATCAA
CTCCCCCTGTTTGTCTGAGCCGTATTAATTACTIONGCCGTTCTTCTCCTCCTTTCTCTT

CCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACCATGCTCTTAACCGATCGAAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGAGGAGACCCAATCCTCTACCAACACCTG

Ebra_46899

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATCCGGGCCGAACCTAAGCCAGCCTGGGTCTTACTCGGAGACGACCAGA
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATA
CCAATCATGATTGGTGGCTTTGGAACTGGCTTATTCCGCTGATGATCGGGGCC
CCTGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCTCCTTC
GTTCTTCTTCTCCTGGCCTCCTCAGGAGTCGAGGCAGGGGCCGGAACGGGTT
GAACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTGGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTG
ACCTAACCATCTTCTCCCTTCACTTAGCGGGGATCTCCTCCATCCTTGGAGCAAT
CAACTTTATCACAACAATTATTAACATGAAACCCCCAGCAATTACTIONCAGTATCAA
CTCCCCGTGTTGTCTGAGCCGTATTAATTACTIONGCCGTTCTTCTCCTCCTTTCTCTT
CCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACCATGCTCTTAACCGATCGGAACCTAAACACC
ACCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGAGGAGACCCAATCCTCTACCAACACCTG

Eli23

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCCC
TGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTCA
TTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTGA
ACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGAC
CTAACCATCTTTTCTTGCCTTAGCAGGGATCTCCTCCATTCTTGGGGCAATCA
ACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTIONCAATATCAGACG
CCACTATTGCTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTCTTCC
AGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCAC
GTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli22

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCTTGCCTTAGCAGGGATCTCCTCCATTCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTIONCAATATCAGAC
GCCACTATTGCTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTCTTC

CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli21

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTACTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTGTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTATTCTACTTCTCTCTCTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCTTGCC?TTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGG?AGACCCAATCCTTAGCAGACCCC??

Eli20

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATTCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTCTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli14

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACCCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTCTTC

CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli12

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli09

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli11

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTTTC

CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli10

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli_Epl29

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli_Epl28

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCATAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCCTTGCACTTAGCAGGGATCTCCTCCATTCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATAAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTTTC

CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eli_Epl27

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCACTAATGATTGGAGCCCC
TGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCTCCCTCA
TTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTGA
ACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGAC
CTAACCATCTTTTCTTGCCTTAGCAGGCATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATCA
ACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACTCAATATCAGACG
CCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTCTCC
AGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCAC
GTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCATTACCAGCACCTC

Eli_Epl26

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCCCTAAGCCT
GCTGATCCGAGCTGAACTAAGCCAGCCCGGATCCTTACTCGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAATCATGATCGGTGGCTTTGGCAACTGACTTATCCCACTAATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCTCCCTC
ATTCCTCCTTCTTCTAGCCTCCTCAGGGGTTGAAGCAGGGGCCGGAACAGGGTG
AACCGTCTACCCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCTGGAGCTTCCGTTGA
CCTAACCATCTTTTCTTGCCTTAGCAGGGATCTCCTCCATCCTTGGGGCAATC
AACTTTATTACTACGATCATTAAACATGAAACCTCCAGCAATTACCCAATATCAGAC
GCCACTATTCGTCTGAGCTGTGCTTATTACTGCCGTTCTTCTACTTCTCTCTCTTC
CAGTCCTAGCCGCCGGCATCACCATGCTGTTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CGTTCTTTGACCCTGCGGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAGCACCTC

Eax01

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGGACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCTGAACTAAGCCAACCCGGATCCTTACTTGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATAGTTATAC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGGCTTATTCCGCTTATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCCATC
ATTCCTTCTTCTTCTGGCTTCTCAGGGGTTGAGGCAGGGGCCGGGACGGGAT
GAACCGTTTACCCACCTCTGGCAGGCAACCTGGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTG
ACCTAACCATTTTTTCTCTCCACTTAGCAGGGATTTCTCCATCCTCGGGGCAAT
CAACTTCATTACTACGATCATCAACATGAAACCTCCAGCAATCACTCAGTATCAAA
CCCCCTATTCGTTTGGAGCTGTGCTAATTACCGCCGTTCTCCTACTTCTCTCTCT

TCCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACTATGCTCTTGACCGATCGAAACCTGAACAC
CACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAGCACCTC

Eax02

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGGACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCTGAACTAAGCCAACCCGGATCCTTACTTGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATAGTTATAC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGGCTTATTCCGCTTATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCCATC
ATTCCTTCTTCTTCTGGCTTCCTCAGGGGTTGAGGCAGGGGCCGGGACGGGAT
GAACCGTTTACCCACCTCTGGCAGGCAACCTGGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTG
ACCTAACCATTTTTTCTCTCCACTTAGCAGGGATTTCTCCATCCTCGGGGCAAT
CAACTTCATTACTACGATCATCAACATGAAACCTCCAGCAATCACTCAGTATCAAA
CCCCCTATTCGTTTGAGCTGTGCTAATTACCGCCGTTCTCCTACTTCTCTCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACTATGCTCTTGACCGATCGAAACCTGAACAC
CACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAGCACCTC

Eax_ECO23

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGGACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCTGAACTAAGCCAACCCGGATCCTTACTTGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATAGTTATAC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGGCTTATTCCGCTTATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCCATC
ATTCCTTCTTCTTCTGGCTTCCTCAGGGGTTGAGGCAGGGGCCGGGACGGGAT
GAACCGTTTACCCACCTCTGGCAGGCAACCTGGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTG
ACCTAACCATTTTTTCTCTCCACTTAGCAGGGATTTCTCCATCCTCGGGGCAAT
CAACTTCATTACTACGATCATCAACATGAAACCTCCAGCAATCACTCAGTATCAAA
CCCCCTATTCGTTTGAGCTGTGCTAATTACCGCCGTTCTCCTACTTCTCTCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACTATGCTCTTGACCGATCGAAACCTGAACAC
CACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAGCACCTC

Eax06

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGGACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCTGAACTAAGCCAACCCGGATCCTTACTTGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATAGTTATAC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGGCTTATTCCGCTTATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCCATC
ATTCCTTCTTCTTCTGGCTTCCTCAGGGGTTGAGGCAGGGGCCGGGACGGGAT
GAACCGTTTACCCACCTCTGGCAGGCAACCTGGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTG
ACCTAACCATTTTTTCTCTCCACTTAGCAGGGATTTCTCCATCCTCGGGGCAAT
CAACTTCATTACTACGATCATCAACATGAAACCTCCAGCAATCACTCAGTATCAAA
CCCCCTATTCGTTTGAGCTGTGCTAATTACCGCCGTTCTCCTACTTCTCTCTCT

TCCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACTATGCTCTTGACCGATCGAAACCTGAACAC
CACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAGCACCTC

Eax04

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGGACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCTGAACTAAGCCAACCCGGATCCTTACTTGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATAGTTATAC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGGCTTATTCCGCTTATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCCATC
ATTCCTTCTTCTTCTGGCTTCCTCAGGGGTTGAGGCAGGGGCGGGACGGGAT
GAACCGTTTACCCACCTCTGGCAGGCAACCTGGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTG
ACCTAACCATTTTTTCTCTCCACTTAGCAGGGATTTCTCCATCCTCGGGGCAAT
CAACTTCATTACTACGATCATCAACATGAAACCTCCAGCAATCACTCAGTATCAAA
CCCCCTATTCGTTTGAGCTGTGCTAATTACCGCCGTTCTCCTACTTCTCTCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACTATGCTCTTGACCGATCGAAACCTGAACAC
CACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAGCACCTC

Eax03

CCTCTATATAATCTTTGGTGCTTGAGCAGGAATAGTGGGGACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCTGAACTAAGCCAACCCGGATCCTTACTTGGAGACGACCAGAT
TTATAATGTGGTGGTCACCGCCCACGCTTTTGTAAATAATTTTCTTTATAGTTATAC
CAATCATGATTGGTGGCTTTGGCAACTGGCTTATTCCGCTTATGATCGGAGCCC
CTGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTCTGACTTCTTCCCCATC
ATTCCTTCTTCTTCTGGCTTCCTCAGGGGTTGAGGCAGGGGCGGGACGGGAT
GAACCGTTTACCCACCTCTGGCAGGCAACCTGGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTG
ACCTAACCATTTTTTCTCTCCACTTAGCAGGGATTTCTCCATCCTCGGGGCAAT
CAACTTCATTACTACGATCATCAACATGAAACCTCCAGCAATCACTCAGTATCAAA
CCCCCTATTCGTTTGAGCTGTGCTAATTACCGCCGTTCTCCTACTTCTCTCTCT
TCCTGTTCTGGCCGCTGGCATCACTATGCTCTTGACCGATCGAAACCTGAACAC
CACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAGCACCTC

Emaff09

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCCGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTACTCCTTTTACTCTCATTAC

CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff07

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff06

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff03

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT

CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff01

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff05

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff04

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC

CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Emaff02

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em07

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em06

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC

CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em03

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em02

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em08

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTACTGCCGTA CTCTTTACTCTCATTAC

CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em05

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTAATGCGTACTCCTTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Em04

CCTCTACATAATTTTTGGTGCTTGGGCAGGAATAGTGGGAACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGGGCGGAGCTAAGTCAACCCGGATCTTTACTAGGGGACGACCAAAT
TTATAATGTGGTAGTCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTTATGC
CAGTTATGATTGGCGGCTTTGGCAATTGACTGATCCCGCTAATGATTGGGGCCC
CCGACATGGCATTCCCCCGGATAAATAATATGAGCTTCTGACTCCTTCCTCCATC
ATTCCTTCTTCTACTTGCCTCCTCAGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGAACAGGATG
AACTGTCTACCCGCCTCTGGCGGGTAACCTAGCCCATGCCGGAGCTTCTGTTGA
CCTAACCATCTTCTCCCTTCACCTGGCGGGGATCTCCTCAATCCTAGGAGCAATT
AACTTTATCACAACAATCATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTACTCAGTATCAAAC
CCCCCTGTTTCGTATGAGCTGTATTAATTAATGCGTACTCCTTTTACTCTCATTAC
CAGTCCTGGCCGCCGGGATTACAATGCTCCTGACCGATCGAAACCTAAACACCA
CCTTCTTTGACCCCGCGGGAGGGGGTGACCCAATTCTCTACCAGCACCTC

Dbr02

CCTGTATATAATCTTCGGTGCTTGGGCAGGAATGGTGGGCACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGAGCTGAGCTAAGCCAGCCGGATCTTTACTTGGGGATGACCAGAT
TTATAATGTAGTGGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTTCTTTATAGTTATGC
CAATTATGATTGGTGGCTTTGGTAACTGACTCATCCCTCTTATGATCGGAGCCCC
CGACATGGCATTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCCTCA
TTCTACTTCTCCTCGCTTCTTCTGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGGACCGGATGA
ACAGTCTACCCCCCATTGGCCGGCAACCTGGCCCATGCAGGAGCTTCCGTTGA
CTTAACTATTTTCTCACTCCACCTGGCAGGAATTTCTCAATCCTTGGGGCAATC
AACTTCATTACAACCATCATTAAATATGAAACCTCCTGCTATTACCCAGTATCAGAC
CCCTCTGTTTGTGAGCAGTTCTGATTACTGCTGTACTTCTTCTTGTCTCTCC

CTGTCTTAGCTGCCGGGATCACAATGCTCCTAACCGATCGAAACCTAAACACCA
CTTTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAACACCTC

Dbr01

CCTGTATATAATCTTCGGTGCTTGAGCAGGAATGGTGGGCACGGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGAGCTGAGCTAAGCCAGCCCGGATCTTTACTTGGGGATGACCAGAT
TTATAATGTAGTGGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATGC
CAATTATGATTGGTGGCTTTGGTAACTGACTCATCCCTCTTATGATCGGAGCCCC
CGACATGGCATTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCCTCA
TTCCTACTTCTCCTCGCTTCTTCTGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGGACCGGATGA
ACAGTCTACCCCCCATTGGCCGGCAACCTGGCCCATGCAGGAGCTTCCGTTGA
CTTAACTATTTTCTCACTCCACCTGGCAGGAATTTCTCAATCCTTGGGGCAATC
AACTTCATTACAACCATCATTAAACATGAAACCTCCTGCTATTACCCAGTATCAGAC
CCCTCTGTTTGTGGAGCAGTTCTGATTACTGCTGTACTTCTTCTTGTCTCTCC
CTGTCTTAGCTGCCGGGATCACAATGCTCCTAACCGATCGAAACCTAAACACCA
CTTTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCAGCCAA-ACCTC

Dbr_ECO11

CCTGTATATAATCTTCGGTGCTTGAGCAGGAATGGTGGGCACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGAGCTGAGCTAAGCCAGCCCGGATCTTTACTTGGGGATGACCAGAT
TTATAATGTAGTGGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATGC
CAATTATGATTGGTGGCTTTGGTAACTGACTCATCCCTCTTATGATCGGAGCCCC
CGACATGGCATTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCCTCA
TTCCTACTTCTCCTCGCTTCTTCTGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGGACCGGATGA
ACAGTCTACCCCCCATTGGCCGGCAACCTGGCCCATGCAGGAGCTTCCGTTGA
CTTAACTATTTTCTCACTCCACCTGGCAGGAATTTCTCAATCCTTGGGGCAATC
AACTTCATTACAACCATCATTAAATATGAAACCTCCTGCTATTACCCAGTATCAGAC
CCCTCTGTTTGTGGAGCAGTTCTGATTACTGCTGTACTTCTTCTTGTCTCTCC
CTGTCTTAGCTGCCGGGATCACAATGCTCCTAACCGATCGAAACCTAAACACCA
CTTTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAACACCTC

Db_ECO10

CCTGTATATAATCTTCGGTGCTTGAGCAGGAATGGTGGGCACGGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGAGCTGAGCTAAGCCAGCCCGGATCTTTACTTGGGGATGACCAGAT
TTATAATGTAGTGGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATGC
CAATTATGATTGGTGGCTTTGGTAACTGACTCATCCCTCTTATGATCGGAGCCCC
CGACATGGCATTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCCTCA
TTCCTACTTCTCCTCGCTTCTTCTGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGGACCGGATGA
ACAGTCTACCCCCCATTGGCCGGCAACCTGGCCCATGCAGGAGCTTCCGTTGA
CTTAACTATTTTCTCACTCCACCTGGCAGGGATTTCTCAATCCTTGGGGCAATC
AACTTCATTACAACCATCATTAAATATGAAACCTCCTGCTATTACCCAGTATCAGAC
CCCTCTGTTTGTGGAGCAGTTCTGATTACTGCTGTTCTTCTTCTTGTCTCTCC

CTGTCTTAGCTGCCGGGATCACAATGCTCCTAACCGATCGAAACCTAAACACCA
CTTTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAACACCTC

Db_ECO09

CCTGTATATAATCTTCGGTGCTTGAGCAGGAATGGTGGGCACAGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGAGCTGAGCTAAGCCAGCCCGGATCTTTACTTGGGGATGACCAGAT
TTATAATGTAGTGGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATGC
CAATTATGATTGGTGGCTTTGGTAACTGACTCATCCCTCTTATGATCGGAGCCCC
CGACATGGCATTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCCTCA
TTCCTACTTCTCCTCGCTTCTTCTGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGGACCGGATGA
ACAGTCTACCCCCCATTGGCCGGCAACCTGGCCCATGCAGGAGCTTCCGTTGA
CTTAACTATTTTCTCACTCCACCTGGCAGGAATTTCTCAATCCTTGGGGCAATC
AACTTCATTACAACCATCATTAAATATGAAACCTCCTGCTATTACCCAGTATCAGAC
CCCTCTGTTTGTGTTGAGCAGTTCTGATTACTGCTGTACTTCTTCTTGTCTCTCC
CTGTCTTAGCTGCCGGGATCACAATGCTCCTAACCGATCGAAACCTAAACACCA
CTTTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTTTACCAACACCTC

Db_ECO08

CCTGTATATAATCTTCGGTGCTTGAGCAGGAATGGTGGGCACGGCCCTCAGCCT
GCTGATTCGAGCTGAGCTAAGCCAGCCCGGATCTTTACTTGGGGATGACCAGAT
TTATAATGTAGTGGTCACTGCCCATGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATGC
CAATTATGATTGGTGGCTTTGGTAACTGACTCATCCCTCTTATGATCGGAGCCCC
CGACATGGCATTCCCTCGAATGAATAACATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCCTCA
TTCCTACTTCTCCTCGCTTCTTCTGGAGTTGAAGCAGGGGCTGGGACCGGATGA
ACAGTCTACCCCCCATTGGCCGGCAACCTGGCCCATGCAGGAGCTTCCGTTGA
CTTAACTATTTTCTCACTCCACCTGGCAGGAATTTCTCAATCCTTGGGGCAATC
AACTTCATTACAACCATCATTAAACATGAAACCTCCTGCTATTACCCAGTATCAGAC
CCCTCTGTTTGTGTTGAGCAGTTCTGATTACTGCTGTACTTCTTCTTGTCTCTCC
CTGTCTTAGCTGCCGGGATCACAATGCTCCTAACCGATCGAAACCTAAACACCA
CTTTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATCCTCTACCAACACCTC

Euci154

CCTCTACCTCATCTTTGGTGCCTGGGCGGGTATAGTGGGGACGGCCCTTAGCCT
ACTCATTTCGAGCTGAGTTAAGCCAGCCCGGGTCTCTTTTAGGAGATGATCAAATT
TATAACGTCATCGTCACAGCCCATGCGTTCGTAATGATCTTTTTTATGGTAATGC
CAATTATGATTGGGGGCTTTGGAAATTGACTTATCCCCCTAATGATTGGGGCCCC
AGATATAGCATTTCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCT
TTTATTCTTCTCCTGGCTTCTTCAGGGGTGGAAGCAGGGGCTGGGACCGGGTGA
ACTGTCTACCCCCCCTTAGCAGGCAACTTAGCACATGCAGGAGCATCAGTGGAC
CTGACTATCTTCTCCCTTCACCTTGCTGGAATCTCCTCAATTTAGGTGCAATCAA
CTTTATTACAACCATTATTAATATAAAACCCCCAGCCATCTCCCAATATCAGACAC
CCTTTTTCGTCTGAGCTGTCCTAATTACAGCAGTCCTGCTACTTCTCTCGCTTCC

CGTTCTAGCTGCCGGCATTACAATGCTTCTAACAGATCGAAACTTAAATACCACA
TTCT??

Euci125

??
??
???????ATGATCTTTTTTATGGTAATGCCAATTATGATTGGGGGCTTTGGAAATTGA
CTTATCCCCCTAATGATTGGGGCCCCAGATATAGCATTTCCCCGAATAACAACA
TGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCTTTATTCTTCTCCTGGCTTCTTCAGGGGT
GGAAGCAGGGGCTGGGACCGGGTGAAGTGTCTACCCCCCTTAGCAGGCAACT
TAGCACATGCAGGAGCATCAGTGGACCTGACTATCTTCTCCCTTCACCTTGCTG
GAATCTCCTCAATTTTAGGTGCAATCAACTTTATTACAACCATTATTAATAAAAAC
CCCCAGCCATCTCCCAATATCAGACACCCCTTTTCGTCTGAGCTGTCCTAATTAC
AGCAGTCCTGCTACTTCTCTCGCTTCCCGTTCTAGCTGCCGGCATTACAATGCTT
CTAACAGATCGAAACTTAAATACCACATTCTTTGACCCCGCAGGAGGAGGAGAC
CCCATCCTCTACCAGCACCTC

Gc_ECO04

CCTCTACCTCGTCTTTGGTGCTTGAGCTGGTATAGTAGGTACAGCCCTAAGCCT
GCTCATCCGAGCTGAACTAAGCCAACCTGGCTCTCTTTTAGGAGACGACCAGAT
CTACAACGTCATTGTTACGGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTCATAGTAATAC
CAATCATGATCGGAGGGTTTGGAAACTGACTCATCCCCCTTATGATCGGCGCCC
CTGACATGGCATTTCCTCGCATGAATAACATGAGTTTCTGACTTCTTCCCCCTC
TTTCTCCTTCTCCTGGCTTCTTCAGGGGTAGAGGCCGGAGCTGGAACGGGGT
GAACAGTTTACCCTCCCCTAGCCGAACTTAGCACACGCTGGGGCATCCGTAG
ACTTAACCATCTTTTCCCTTCATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTCTTGGTGCTATTA
ATTTTATCACAACAATTATTAACATAAAAACCCCCAGCTATCTCACAATACCAAACC
CCGCTCTTTGTTTGAGCTGTTTTAATTACCGCAGTGCTTCTTCTCCTCTCACTTCC
TGTTCTAGCCGCTGGTATTACCATGCTACTAACAGATCGAAATCTAAACACTACC
TTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAACACCTG

Gc_ECO03

CCTCTACCTCGTCTTTGGTGCTTGAGCTGGTATAGTAGGTACAGCCCTAAGCCT
GCTCATCCGAGCTGAACTAAGCCAACCTGGCTCTCTTTTAGGAGACGACCAGAT
CTACAACGTCATTGTTACGGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTCATAGTAATAC
CAATCATGATCGGAGGGTTTGGAAACTGACTCATCCCCCTTATGATCGGCGCCC
CTGACATGGCATTTCCTCGCATGAATAACATGAGTTTCTGACTTCTTCCCCCTC
TTTCTCCTTCTCCTGGCTTCTTCAGGGGTAGAGGCCGGAGCTGGAACGGGGT
GAACAGTTTACCCTCCCCTAGCCGAACTTAGCACACGCTGGGGCATCCGTAG
ACTTAACCATCTTTTCCCTTCATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTCTTGGTGCTATTA
ATTTTATCACAACAATTATTAACATAAAAACCCCCAGCTATCTCACAATACCAAACC
CCGCTCTTTGTTTGAGCTGTTTTAATTACCGCAGTGCTTCTTCTCCTCTCACTTCC

TGTTCTAGCCGCTGGTATTACCATGCTACTAACAGATCGAAATCTAAACACTACC
TTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAACACCTG

Gc_ECO02

CCTCTACCTCGTCTTTGGTGCTTGAGCTGGTATAGTAGGTACAGCCCTAAGCCT
GCTCATCCGAGCTGAACTAAGCCAACCTGGCTCTCTTTTAGGAGACGACCAGAT
CTACAACGTCATTGTTACGGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTCATAGTAATAC
CAATCATGATCGGAGGGTTTGGAACTGACTCATCCCCCTTATGATCGGCGCCC
CTGACATGGCATTTCCTCGCATGAATAACATGAGTTTCTGACTTCTTCCCCCTC
TTTCTCCTTCTCCTGGCTTCTTCAGGGGTAGAGGCCGGAGCTGGAACGGGGT
GAACAGTTTACCCTCCCCTAGCCGGAACTTAGCACACGCTGGGGCATCCGTAG
ACTTAACCATCTTTCCCTTCATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTCTTGGTGCTATTA
ATTTTATCACAACAATTATTAACATAAAAACCCCCAGCTATCTCACAATACCAAACC
CCGCTCTTTGTTTGAGCTGTTTTAATTACCGCAGTGCTTCTTCTCCTCTCACTTCC
TGTTCTAGCCGCTGGTATTACCATGCTACTAACAGATCGAAATCTAAACACTACC
TTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAACACCTG

Gc_ECO01

CCTCTACCTCGTCTTTGGTGCTTGAGCTGGTATAGTAGGTACAGCCCTAAGCCT
GCTCATCCGAGCTGAACTAAGCCAACCTGGCTCTCTTTTAGGAGACGACCAGAT
CTACAACGTCATTGTTACGGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTCATAGTAATAC
CAATCATGATCGGAGGGTTTGGAACTGACTCATCCCCCTTATGATCGGCGCCC
CTGACATGGCATTTCCTCGCATGAATAACATGAGTTTCTGACTTCTTCCCCCTC
TTTCTCCTTCTCCTGGCTTCTTCAGGGGTAGAGGCCGGAGCTGGAACGGGGT
GAACAGTTTACCCTCCCCTAGCCGGAACTTAGCACACGCTGGGGCATCCGTAG
ACTTAACCATCTTTCCCTTCATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTCTTGGTGCTATTA
ATTTTATCACAACAATTATTAACATAAAAACCCCCAGCTATCTCACAATACCAAACC
CCGCTCTTTGTTTGAGCTGTTTTAATTACCGCAGTGCTTCTTCTCCTCTCACTTCC
TGTTCTAGCCGCTGGTATTACCATGCTACTAACAGATCGAAATCTAAACACTACC
TTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGGAGACCCAATCCTTTACCAACACCTG

;

END;