



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHETUMAL

## Identificación de larvas de peces del Cenote “Cocalitos”, Bacalar, Quintana Roo, México, utilizando morfología tradicional y código de barras de ADN

Tesis para obtener el Grado de:

**Maestro en Manejo de Zona Costera**

Presenta:

**Biól. José Ángel Cohuo Colli**

Directora:

**Dra. Carmen Amelia Villegas Sánchez**

Codirectora:

**Dra. Martha Elena Valdez Moreno**

Chetumal, Quintana Roo, México. Diciembre de 2018



Chetumal, Q. Roo., 30 de octubre 2018.

**ASUNTO:** Autorización de impresión.

**C. JOSÉ ÁNGEL COHUÓ COLLÍ**

De acuerdo a las Disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que el Comité Tutorial le hizo con respecto a su tesis titulada:

**“IDENTIFICACIÓN DE LARVAS DE PECES DEL CENOTE “COCALITOS” BACALAR QUINTANA ROO, MÉXICO, UTILIZANDO MORFOLOGÍA TRADICIONAL Y CÓDIGO DE BARRAS DE ADN”**

La División a mi cargo le concede la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

(R)

**ATENTAMENTE**  
*“Cultura Ciencia y Tecnología para la superación de México”*

**DRA. ALICIA CARRILLO BASTOS**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE CHETUMAL  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c.p. Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Minutario.  
ACB/Gaby



Av. Insurgentes No. 330, Esq. Andrés Quintana Roo, Colonia David Gustavo Gutiérrez, Apdo.  
Postal 267, C.P.77013 Chetumal Quintana Roo México, Tel. (983) 8322330 y 8321019  
Ext. 101

[www.itchetumal.edu.mx](http://www.itchetumal.edu.mx)



## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a mi esposa Eunice y a mis hijos: Ángel Manuel y José Alejandro, quienes han estado conmigo en las buenas y en las malas, les agradezco su paciencia, respeto y sobre todo su amor. Sé que hemos hecho muchos sacrificios y espero que el tiempo nos lo recompense. Espero que este trabajo sea uno de tantos ejemplos para mis hijos y que sirva de superación para que sigan preparándose cada vez más y logren sus metas más anheladas.

También lo dedico a mis padres: Maximiliano y Silvia Amalia, no dudo en decir que tengo a los mejores padres, ya que han estado en todo momento conmigo y con mi familia, ayudándonos y sacándonos adelante, los quiero mucho y espero transmitir sus valores tan preciados a mis hijos para que sean personas de bien.

A mi hermana Gladys, a mí cuñado José, sobrina Isla y Max, quienes me han regalado su amistad, amor, y buenos momentos. También lo quiero mucho.

A mis compadres Cristina, Telmo y a sus hijas: Cristel, Priscila y Ximena, quienes nos brindan su amistad sin condición y por su ayuda en los malos momentos.

Es difícil nombrar a toda mi familia y a los amigos que han estado al tanto de nosotros y me gustaría hacerlo, pero no acabaría por que tengo muchos familiares maravillosos y amigos entrañables, les agradezco sinceramente todo su apoyo y amistad.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar el posgrado.

Al Instituto Tecnológico de Chetumal por el apoyo institucional

Al Colegio de la Frontera Sur, unidad Chetumal por el apoyo en infraestructura.

A mi directora de tesis la Dra. Carmen Villegas, por su paciencia, por sus comentarios y apoyo que me sirvieron para terminar mi tesis.

A mi codirectora de tesis la Dra. Martha Elena Valdez Moreno por alentarme a continuar con mis estudios de posgrado, sus valiosos y atinados comentarios para mejorar la tesis, por su paciencia y sobre todo por su amistad y consejos que me han servido para cumplir esta meta.

A la Red de Códigos de Barras de la Vida por el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras.

Al laboratorio de Códigos de Barras de la Vida, nodo Chetumal por el apoyo en el equipo y material para la obtención del material genético y su amplificación.

Al Dr. Manuel Elías Gutiérrez por sus valiosos consejos que me ayudaron a mejorar en muchos aspectos y por el apoyo en las colectas en campo.

A la Sra. Verónica Buitrón, por las facilidades que nos brindó en su balneario para poder recolectar en el cenote cocalitos.

A la Maestra Lourdes Vásquez y el Dr. Eloy Sosa Cordero, por su invaluable amistad y por sus consejos atinados en muchos momentos.

A la Dra. Rebeca Gasca Serrano, por su amistad y apoyo en momentos complicados y por facilitarme el uso del microscopio a su cargo.

Al Dr. Eduardo Suárez Morales por sus comentarios de apoyo y sobre todo su amistad.

A mis profesores de los cursos de posgrado, Dra. Carmen Villegas, MC Alejandro Medina Quej, Dra. Alicia Carrillo Bastos y Dr. José Castro.

A la Dra. Alma Estrella García Morales por asesorarme en los protocolos y técnicas moleculares. A la MIT Janneth Adriana Padilla Saldívar por la elaboración del mapa.

En especial a mis amigos y compañeros de posgrado, por los momentos que nos hicieron compartir experiencias y conocimientos, a Romeo, Dariel, Chloe, María José, Oscar, Pedro, María de los Ángeles y Levita. Les deseo éxito.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>1 Introducción</b> .....	2
<b>2 Antecedes</b> .....	6
<b>3 Objetivos</b> .....	10
3.1 Objetivo General.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
<b>4 Metodología</b> .....	11
4.1 Área de estudio.....	11
4.2 Método.....	12
4.2.1 Trabajo de campo.....	12
4.2.2 Trabajo de laboratorio.....	13
4.2.3 Fotografías.....	14
4.2.4 Obtención de tejido para los Códigos de Barras de la Vida.....	14
4.2.5 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen COI	15
4.3 Análisis de los datos.....	17
<b>5 Resultados</b> .....	19
<b>6 Discusión</b> .....	24
<b>7 Conclusiones</b> .....	32
<b>8 Anexos</b> .....	34
<b>9 Literatura consultada</b> .....	55

## Resumen

Por métodos tradicionales el estudio de larvas de peces trae consigo dificultades para su correcta identificación taxonómica, debido a que los organismos son de talla pequeña (1 a 15 mm), no han completado su desarrollo y sus características son muy variables. En el caso del estudio de larvas dulceacuícolas el reto es aún mayor, ya que sumado a las dificultades anteriores, prácticamente no existen estudios sobre ellas. Una de las herramientas moleculares que ha ayudado para la identificación de las especies, incluyendo los peces, es el Código de Barras de Vida (CBV), el cual utiliza genes estandarizados. El objetivo del presente trabajo fue identificar larvas de peces del cenote Cocalitos, Laguna de Bacalar, México, por medio de métodos tradicionales y el gen mitocondrial COI. Los muestreos se realizaron durante 2015 en tres temporadas: secas (Abril, Junio), lluvias (Julio, Agosto), y nortes (Diciembre). El arte de pesca utilizado fue la trampa de luz, la cual se colocó durante toda la noche. Se obtuvieron un total de 2,369 larvas de peces, de las cuales se seleccionaron 112 larvas para su identificación morfológica. Se identificaron 17 morfotipos. A las 112 larvas se les extrajo una muestra de tejido, posteriormente se realizó la extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen COI. Por taxonomía tradicional se identificaron tres larvas a especie (*Bathygobius soporator*), los restantes a género (*Gobiosoma* sp., *Ctenogobius* sp.), a familia (*Engraulidae* y *Gobiidae*) y a orden (*Perciformes*). Con la técnica de CBV se obtuvieron 101 secuencias, identificándose en total 6 especies (*Dorosoma petenense*, *Cyprinodon artifrons*, *Bathygobius soporator*, *Lophogobius cyprinoides*, *Gobiosoma yucatanum* y *Ctenogobius fasciatus*) y una familia (*Engraulidae*). *Gobiosoma yucatanum* representa nuevo registro para la Laguna de Bacalar. Aplicando la técnica de CBV como herramienta para la identificación se pudo identificar a nivel de especie las larvas de peces dulceacuícolas del cenote Cocalitos y Laguna de Bacalar, lo que coadyuva en la gestión y manejo de este sistema lagunar.

# 1 Introducción

Los vertebrados vivos en el mundo suman más de 60,000 especies y poco más de la mitad (32,000 especies) son peces (Nelson *et al.* 2016). Nelson *et al.* (2016) reportó que existen 85 órdenes y 536 familias de peces reconocidas a nivel mundial, asimismo menciona que dos terceras partes de todas las especies de ese gran número de familias son peces dulceacuícolas.

La comunidad íctica exhibe gran variedad morfológica, en su distribución y hábitats que ocupa, por lo que tienen diferentes y extraordinarias adaptaciones para todos los ambientes acuáticos del planeta; la diversidad que representan ha hecho que su clasificación sea un reto para muchos taxónomos tradicionales (Nelson *et al.* 2016).

México es conocido por ser uno de los países con más biodiversidad en el mundo debido principalmente a su ubicación geográfica y topografía. En cuanto a peces, hasta este momento se reconocen más de 2,700 especies de peces, de los cuales 505 son dulceacuícolas, 2,224 marinos y 563 estuarinos y vicarios (Espinosa-Pérez, 2014).

Richards (2005) define, de manera general, que el ciclo de vida de los peces está compuesto por las siguientes fases o estadios: huevo, larva con saco vitelino, larva, juvenil y adulto.

Los huevos de muchos peces costeros y casi todos los peces de agua dulce son de tipo demersal, los cuales se caracterizan por ser frecuentemente adhesivos y más grandes que los huevos pelágicos (<1mm) (Kendall *et al.* 1981; Richards, 2005).

De los huevos eclosionan las larvas con saco vitelino, que son individuos poco desarrollados que nadan débilmente y dependen de su yema para nutrirse. Se caracterizan por poseer el cuerpo alargado, carecer de pigmentos en los ojos, la boca no está desarrollada y se observan los primordios de las aletas pectorales y aleta dorsal (Richards 2005).

Después de que la larva absorbe la yema, da paso a la etapa de larva, la cual se caracteriza por tener caracteres transitorios, como patrones de pigmentación, en algunos casos la presencia de espinas craneales especializadas y algunas estructuras en las aletas que son adaptaciones para esta fase de su ciclo de vida, además desarrollan características del adulto como número de miómeros, radios y espinas (Kendall *et al.* 1981).

Dependiendo del estado de flexión de la notocorda, el estadio larval se divide en tres sub-estadios: preflexión, flexión y postflexión (Kendall *et al.* 1981; Richards, 2005).

El final de la etapa larval está marcada por una metamorfosis o proceso de transformación, más o menos abrupto dependiendo de la especie, durante la cual la larva se convierte en un juvenil que es morfológicamente similar al adulto y ya presenta los caracteres merísticos característicos de la especie.

La fase de huevo, larva con saco vitelino y larva componen el desarrollo temprano del ciclo de vida de los peces, también conocido como ictioplancton, el cual es muy importante ya que es el que define la tasa de reclutamiento de los juveniles, el tamaño de la población adulta y es cuando ocurre la mayor mortandad (Richards, 2005; Rodríguez *et al.* 2017). Es por estas razones que se hace indispensable la identificación taxonómica de las etapas tempranas de estos organismos.

La mayoría de autores consultados opinan que la fase de larva de los peces es una de las que genera mayor dificultad para su correcta identificación taxonómica, ya que durante ésta las especies presentan muchos cambios morfológicos en comparación con etapas posteriores (Álvarez-Cadena *et al.* 2007); por ejemplo, la morfología de la misma especie puede cambiar rápida y significativamente durante su desarrollo desde las larvas de preflexión a la postflexión y posteriormente hasta la etapa prejuvenil (Ko *et al.* 2013); diferentes especies tienen larvas muy parecidas, debido a su tamaño (1-8 mm) lo que implica el uso de microscopio

para su estudio. Es por esto que para muchos taxónomos es una tarea muy compleja y que en muchas ocasiones no se llega al resultado esperado.

Existen diversos estudios enfocados a la identificación de larvas de peces, sin embargo, la gran mayoría han sido dirigidos a las especies marinas entre los que destacan los trabajos de Leis y Rennis (1983) para la región del Indo-Pacífico, Richards (2005) que publicó una guía de identificación de los estadios tempranos de peces del Centro Oeste del Océano Atlántico, incluyendo el Golfo de México, Mar Caribe y sus márgenes continentales y Fahay (2007) para las larvas de la parte Oeste del Océano Atlántico Norte.

En el caso de larvas dulceacuícolas prácticamente no existen claves de identificación taxonómica. Existen descripciones aisladas de algunas especies principalmente de importancia económica, como por ejemplo la carpa común *Cyprinus carpio*, el bagre *Leiocassis ussuriensis* y la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* entre otros. (Fujimura & Okada, 2007; Park *et al.* 2017; Park *et al.* 2015); por lo que es común recurrir a trabajos disponibles que permitan, en medida de lo posible, aproximarse a una correcta identificación, utilizando guías de identificación para estadios tempranos de peces marinos.

Ante este panorama en el estudio de las larvas de agua dulce, se ha buscado herramientas que permitan la identificación de las especies con buen éxito. Tal es el caso de los Códigos de Barras de Vida o Barcode, el cual utiliza genes estandarizados. Hebert *et al.* (2003) fue quien inicialmente propuso un gen de ADN mitocondrial que codifica para la Citocromo Oxidasa I (COI) y que puede ser usado como marcador genético universal para los animales, utilizando solo los primeros 650 pares de bases (pb) de este gen, de un total de 1,554 pb (Luo *et al.* 2011).

Actualmente se han publicado más de 400 trabajos en los que se ha demostrado la eficacia de esta técnica en la determinación de las especies de peces y cerca de 23 publicaciones con larvas ([http://www.boldsystems.org/index.php/Public\\_Publication\\_BibliographySearch](http://www.boldsystems.org/index.php/Public_Publication_BibliographySearch)).

Por otro lado en el estado de Quintana Roo existen varias lagunas continentales como la “Laguna de Bacalar”, la cual se encuentra en un graben (cuenca tectónica) (Miller *et al.* 2009). En la actualidad la laguna de Bacalar se encuentra bajo una fuerte presión antropogénica por actividad turística debido su belleza natural y por su diversidad biológica como los estromatolitos, pero, además, recientemente se publicó que esta laguna también es un refugio para las etapas juveniles de una especie de pez cuyos adultos han sido solamente recolectados en aguas marinas (Elías-Gutiérrez *et al.* 2018). Este último aspecto nunca había sido considerado para Bacalar, lo que da un mayor realce a este lugar.

Con el presente trabajo se pretende dar a conocer la composición de larvas de peces en el Cenote Cocalitos, por medio de su identificación morfológica y con la ayuda de la técnica de código de barras (Barcode), ya que no se conocen los estadios larvales de peces para aguas dulces en la región. Esto servirá como base para futuros estudios y para coadyuvar para una buena gestión de nuestros recursos naturales como lo es la laguna de Bacalar.

## 2 Antecedentes

A nivel mundial existen diversos estudios sobre larvas de peces que van desde los taxonómicos (Vásquez-Yeomans *et al.* 1998), (Álvarez-Cadena *et al.* 2007), (Ordóñez-López *et al.* 2013), crecimiento (Fuiman, 1983), distribución: vertical (Rodríguez *et al.* 2011), dial y mareas (Lyczkowski-Shultz *et al.* 1990), reclutamiento (Houde, 1994), (Teodósio *et al.* 2016), abundancia (Franco-Gordo *et al.* 2001), comportamiento, habilidades de locomoción (Fisher *et al.* 2000), deformidades (Sfakianakis *et al.* 2015), entre otros; la mayor parte de estos en ambientes marinos y estuarinos.

Los estudios de larvas de peces dulceacuícolas son escasos, en comparación con lo publicado para las especies marinas. Estos estudios realizados en varias partes del mundo sobre todo de lagos: Ontario, Michigan y dos patos (McKenna & Johnson, 2009; Weber *et al.* 2015; Weiss, 1981) y ríos: Paraná, Campaspe y Broken, y Kanawha (Daga *et al.* 2009; Humphries & Lake, 2000; Rider & Margraf, 1997).

En México existen algunos trabajos que han estudiado larvas de peces de agua dulce. La mayoría se enfocan principalmente al conocimiento de estadios tempranos de peces nativos para repoblamiento y acuicultura, como por ejemplo, Green Ruiz (1993), el cual se realizó en la Boca de Aguadulce en el sistema lagunar Huizache-Caimanero, Sinaloa, México. Su estudio se enfocó en la estructura de la comunidad de larvas de peces, principalmente en la abundancia y distribución temporal, con muestreos quincenales y durante un año. El estudio tuvo como resultado una captura de 21,101 larvas, de las cuales el 68.6% consideradas marinas, el 21% estuarinas y el 10% como dulceacuícolas, éste último representado por la familia gobiidae (*Awaous sp.* y *Eleotris pictus*). En este estudio se identificaron 11 especies, 7 géneros y una familia. El 1.6% de las larvas solo se identificó a nivel de familia por su tamaño muy pequeño y por estar maltratadas.

Martínez-Palacios *et al.* (2002), el cual tuvo como objetivo el describir las larvas de *Chirostoma estor estor*, pez nativo del Lago de Pátzcuaro en Michoacán y que se encuentra bajo presión por sobrepesca. Entre los resultados que obtuvieron fue que esta especie no posee un estómago definido, siendo el intestino el que cumple esa función, las larvas tienen un sistema digestivo funcional, por lo que pueden ingerir alimento vivo previo a la absorción completa del saco vitelino. Lo anterior provee una base para poder llevar el cultivo desde huevo a estadios maduros, ayudando a la conservación de esta especie.

Mendoza & Aguilera (2001), llevaron a cabo un estudio sobre estadios tempranos del catán o pejelagarto *Atractosteus spatula* con el propósito de repoblar, realizar acuicultura y poder incluir dieta artificial durante su cultivo. Sus principales resultados con base a estudios morfológicos, histológicos, enzimáticos y de alimentación fue que las larvas tienen una tasa de crecimiento rápida de 1.55 mm/día los primeros 10 días, y ésta aumenta a 5.06 mm/día en los días subsecuentes.

En Quintana Roo, con base a la revisión bibliográfica, hasta el momento no hay estudios sobre larvas de peces dulceacuícolas, pero sí hay avances en el conocimiento en el estadio adulto. Entre los trabajos que destacan están los de Schmitter-Soto (1996) "Catálogo de peces continentales de Quintana Roo", en el cual se incluyen claves taxonómicas de especies dulceacuícolas en diferentes localidades. Gamboa-Pérez & Schmitter-Soto (1999), en el cual el objetivo fue la identificación y distribución de peces cíclidos del litoral de la Laguna de Bacalar.

Cabe destacar el trabajo de Espinosa *et al.* (1993) y Miller *et al.* (2009), quienes hacen una compilación de los peces dulceacuícolas de México que incluye la fauna íctica dulceacuícola del sureste de México.

En cuanto a la técnica de códigos de barra de la vida (CBV) ha sido probada con éxito y ha sido de gran ayuda para la identificación de peces tanto marinos como dulceacuícolas en el mundo. Como se mencionó anteriormente, el uso de esta

técnica está respaldado con más de 400 publicaciones sobre el tema (ver [www.Boldsystems.org](http://www.Boldsystems.org)).

Al igual que en la taxonomía tradicional, la mayoría de los estudios de códigos de barra de la vida sobre larvas de peces, han sido principalmente sobre ambientes marinos y estuarinos en diferentes partes del planeta como por ejemplo en la parte Sur de la Gran Barrera de Coral en Australia, en el cual se usó para el ADN mitocondrial el marcador HVR1 y adicionalmente el COI con diferentes primers para identificar larvas de peces (Pegg *et al.* 2006), en la costa caribeña de Panamá usando el COI para identificar larvas y juveniles de pargo cubera *Lutjanus cyanopterus* (Victor, 2009), en la isla de Monrea de la Polinesia Francesa probando la efectividad de los Códigos de Barra de ADN en la identificación de larvas de peces (Hubert *et al.* 2015), en el Mar de los Sargazos evaluando la dieta cualitativa de las larvas de anguilas europeas (*Anguilla anguilla*) (Riemann *et al.* 2010), en las costas de Quintana Roo y Belice, en la identificación de huevos y larvas de peces marinos con sus adultos (Valdez-moreno *et al.* 2010), en aguas de Taiwan, en el cual con el uso del Barcode se probó la eficacia de la identificación morfológica de larvas de peces realizada por taxónomos (Ko *et al.*, 2013) y en los arrecifes profundos de Curacao para la identificación de una nueva especie de serránido (*Liopropoma olneyi*) con el uso de la taxonomía morfológica y técnica de Barcode (Baldwin & Johnson, 2014).

Con respecto a investigaciones acerca de larvas de peces dulceacuícolas y código de barras de la vida, solo se encontraron dos trabajos puntuales. El primer estudio es el de (Frantine-Silva *et al.* 2015), en el cual se utilizó la técnica molecular para identificar huevos y larvas de peces en la parte media del río Paranapanema en Brasil, el resultado que se obtuvo fue que de 536 muestras genéticas analizadas el 99.81% (535 muestras) tuvieron éxito de identificación a nivel de especie. La segunda investigación fue la de (Becker *et al.* 2015), cuyo objetivo principal fue comparar la exactitud de la identificación morfológica de huevos y larvas de peces del río Araguari y río Pará ubicados en el sureste de Brasil, realizada por dos laboratorios diferentes, y la proporcionada por la herramienta de códigos de barra

de la vida. Con la técnica molecular se pudo identificar el 100% (97 muestras) a nivel de especie, mientras que con la taxonomía tradicional en ambos laboratorios llegaron solo a niveles de orden, familia y género.

Con estos antecedentes se puede asegurar que no hay estudios de identificación taxonómica sobre larvas de peces dulceacuícolas en nuestro país hasta el momento.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Identificar larvas de peces del cenote Cocalitos, Laguna de Bacalar, México por medio de métodos tradicionales y el gen mitocondrial COI (Código de Barras de ADN).

### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar larvas de peces del cenote Cocalitos con claves taxonómicas y el gen mitocondrial COI hasta el nivel taxonómico más fino posible.
- Comparar los resultados de la identificación morfológica con la de Código de Barras de la Vida.
- Elaborar una biblioteca genética de referencia de larvas de peces del área de estudio.
- Comparar la riqueza específica registrada en las tres épocas muestreadas.

## 4 Metodología

### 4.1 Área de estudio

El área seleccionada para este estudio fue el cenote Cocalitos ( $18^{\circ}39'3.56''N$   $88^{\circ}24'33.88''W$ ), está localizado dentro de la Laguna de Bacalar a 300 metros al Noreste del Cenote Azul y a 3.5 kilómetros del poblado de Bacalar (Figura 1).

La Laguna de Bacalar es un sistema lagunar dulceacuícola alargado y estrecho con altas concentraciones de carbonatos y con una longitud aproximada de 40 km de largo y de 1 a 2 km de ancho, y su mayor profundidad es de 20 metros (Gischler *et al.* 2011). Esta laguna se encuentra sobre una plataforma cárstica, en su interior se encuentran tres cenotes: Cocalitos, Esmeralda y Negro, los cuales cuentan con una conexión superficial. Dos cenotes más se encuentran asociados a la laguna que se localizan al sur: el Cenote Azul que se encuentra aislado de las demás y el cenote de Xul-Ha que se conecta a la laguna a través de un canal.

En su parte norte la Laguna de Bacalar tiene un fondo fangoso y sus aguas por lo general son turbias, en su parte central el agua de la laguna es clara y con una capa gruesa de detritos en su fondo, en la parte sur las aguas son transparentes y con un fondo arenoso. La vegetación que rodea a la laguna está compuesta principalmente por manglares, tulares y plantas acuáticas (Oliva-Rivera *et al.*, 2016).

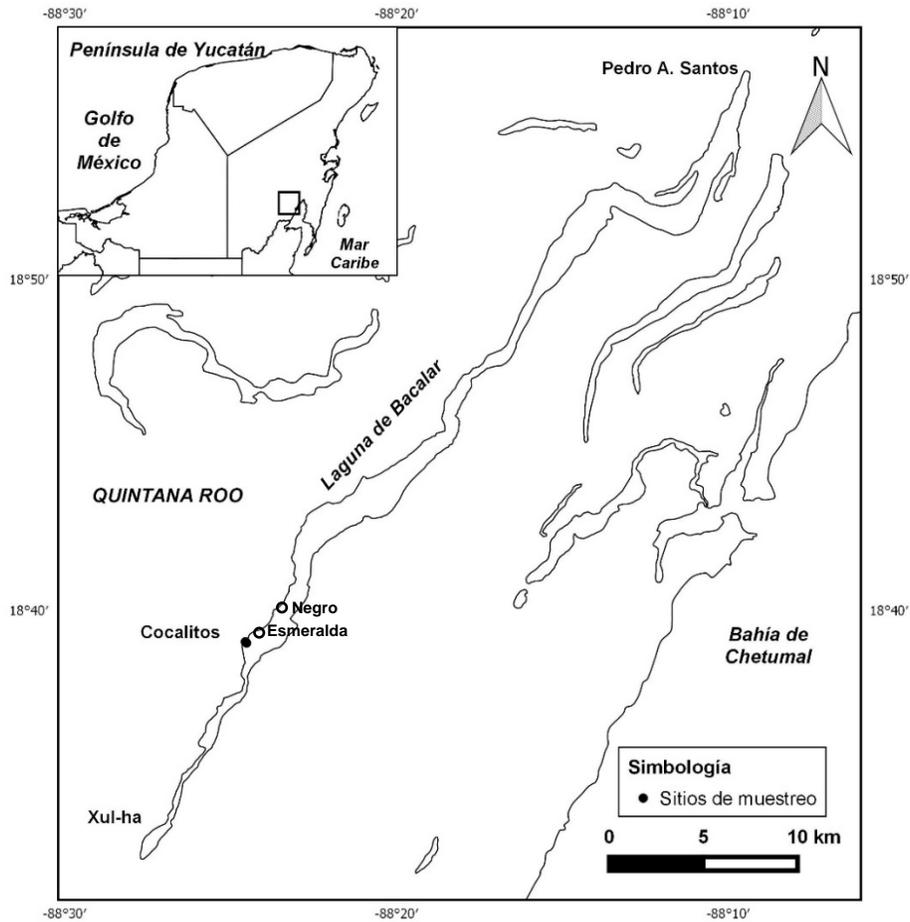


Figura 1. Localización geográfica del sitio de muestreo en la Laguna de Bacalar, Quintana Roo, México.

## 4.2 Método

### 4.2.1 Trabajo de campo

Los muestreos se llevaron a cabo en tres temporadas durante 2015: secas (2 y 18 de Abril, 28 de Junio), lluvias (19 de Julio y 20 de Agosto), y nortes (2 de Diciembre). Para la obtención de las muestras se utilizó como arte de muestreo una trampa de luz (Jones, 2006), la cual se colocó de la siguiente manera: una trampa de luz en los meses de abril, junio, agosto y diciembre a una profundidad

de 5 metros en la parte Norte del cenote (18°39'3.67"N y 88°24'33.89"W); en el mes de julio se colocaron dos trampas una a profundidad de 5 metros en la misma parte Norte y a una distancia de 90 metros al sureste del primer sitio (18°39'1.42"N y 88°24'31.69"W). Durante todos los muestreos las trampas se programaron para que estuviera encendida de 20:00 a 05:00 horas.

Las muestras obtenidas fueron filtradas con un tamiz de 50 µm, lavadas con alcohol etílico al 96% y, luego fueron puestas en hielo para su transporte.

#### **4.2.2 Trabajo de laboratorio**

En el laboratorio las muestras fueron colocadas en refrigerador durante una semana siguiendo el protocolo de preservación propuesto por Elías-Gutiérrez et al. 2018. Pasado este tiempo, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de necton en El Colegio de la Frontera Sur, para realizar la separación y conteo de las larvas de peces se utilizó una pinza suave y microscopio estereoscópico.

Para la identificación morfológica de las larvas, primero se agruparon por tamaños, forma del cuerpo, cabeza, el patrón de pigmentación y la forma del intestino. Para la identificación de larvas al menor nivel taxonómico posible se usó la guía de identificación de Richards (2006), tomando en cuenta las principales características descritas como son: largo y forma del intestino, pigmentos, número de radios, espinas, miómeros, entre otros (Figura 2). Los morfotipos que se diferenciaron mediante identificación tradicional, fueron los que se utilizaron para su posterior análisis por medio de la técnica de códigos de barra de la vida.

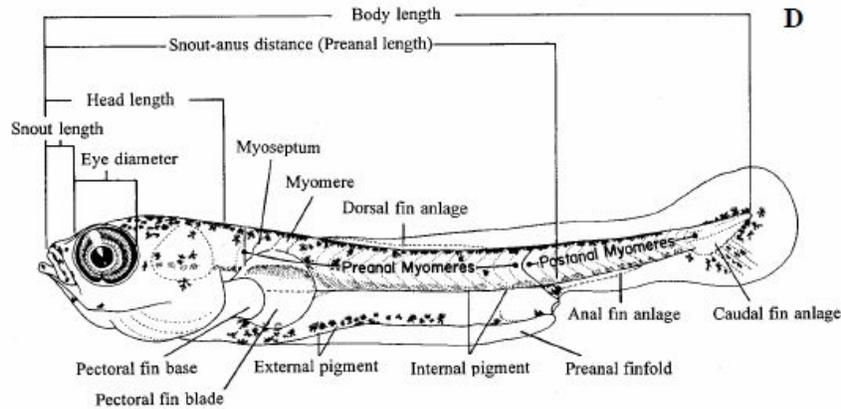


Figura 2. Principales características utilizadas para la identificación de larvas de peces (Imagen tomada de Richards, 2005).

#### 4.2.3 Fotografías

Como parte del registro de organismos y requisito indispensable para incluir los datos a la base de datos de BOLD ([www. BOLDsystems.org](http://www.BOLDsystems.org)), se fotografiaron de 1 a 8 larvas de cada morfotipo con la ayuda de una cámara Canon EOS T3i adaptada a un microscopio estereoscópico o compuesto dependiendo del tamaño del organismo. Cada larva fue fotografiada de 1 a 40 veces. Esta serie de fotos fueron ensambladas utilizando el programa Helicon Focus versión 6.5.1 para obtener fotos de alta definición de toda la larva.

#### 4.2.4 Obtención de tejido para los Códigos de Barras de la Vida

Cada larva seleccionada se le extrajo una pequeña muestra de tejido muscular (2 mm<sup>3</sup> aprox.) o el ojo del lado izquierdo, con ayuda de un microscopio, para ser colocado en una placa Eppendorf™ de 96 pocillos (previo llenado con una gota de alcohol etílico al 96%). Una vez llena la placa, se guardó en un congelador a -20°C para su posterior análisis molecular, durante la extracción de tejido todas las herramientas fueron esterilizadas con flama.

Además, para todos los morfotipos se llenaron cinco bases de datos en el sistema BOLD: información del voucher, datos taxonómicos, detalles del espécimen, datos de colecta y fotografías. Toda la información puede ser consultada en la página web [www.boldsystem.org](http://www.boldsystem.org) dentro del proyecto Bacalar Fish 1(BACFI).

#### **4.2.5 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen COI**

El proceso de extracción del ADN y la amplificación del gen COI se llevó a cabo en el laboratorio de Códigos de Barra de Ecosur Chetumal. Para realizar la extracción del ADN se utilizó el protocolo de (Ivanova *et al.* 2006) a través de placas de fibra de vidrio de 1.0  $\mu\text{m}$  (AcroPrep 96, Pall Co.), como se describe a continuación. Para digerir las muestras de tejido, primeramente se mezclaron 5 ml de buffer lisis para vertebrados (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 y 0.5% SDS) y 0.5 ml de proteinasa K (20 mg/ml) en un recipiente estéril. De la mezcla anterior, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  en cada uno de los 96 pozos de la placa Eppendorf<sup>TM</sup> que contenía las muestras de tejido y se incubó durante toda la noche a 56°C. Al día siguiente la placa se centrifugó a 1500 g durante 15 segundos para bajar el condensado que se formó durante la incubación. Seguidamente usando una pipeta multicanal se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución “Binding Mix” (Binding Buffer y Etanol al 96%) (“Binding Buffer”: 10 mM Tris-HCl pH 6.4, 20 mM EDTA pH 8.0, 6 M GuSCN y 4% Triton X-100), a cada una de las 96 muestras. Se cubrió la placa con una tapa auto adherible y se agitó vigorosamente durante 10-15 segundos y después se centrifugó a 1000 g durante 20 segundos. Posteriormente se removió la tapa y se transfirió la mezcla (aproximadamente 150  $\mu\text{l}$ ) a una placa de fibra de vidrio (PALL1) de 96 pozos, la cual se tapó y se centrifugó a 5000 g durante cinco minutos. Para el primer lavado se agregaron 180  $\mu\text{l}$  de “Protein Wash Buffer” (“Binding Buffer” y alcohol etílico al 96% en proporciones 30/70) en cada uno de los pozos de la placa de fibra de vidrio, y se centrifugó a 5000 g durante 2 minutos. Para el segundo lavado se agregaron 750  $\mu\text{l}$  de “Wash Buffer” (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mM de EDTA pH 8.0, 50 mM de NaCl y alcohol etílico al 96% en una proporción 40/60) en cada uno

de los 96 pozos, y se procedió a centrifugar a 5000 g durante 5 minutos. Después se quitó la tapa de la placa y esta se colocó en la incubadora a 56 °C por 30 minutos para evaporar el alcohol residual. Pasado el tiempo se agregaron en cada pozo de la placa de fibra de vidrio 30 µl de agua ultrapura (precalentada a 56°C) y se dejó incubar por 1 minuto. Finalmente, la placa de fibra de vidrio se ensambló junto con una placa Eppendorff nueva y se centrifugaron a 5000 g durante 5 minutos para coleccionar el ADN en la placa Eppendorff. Una vez obtenido el ADN se usaron 2 µl para la PCR.

La amplificación del gen COI fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo estándar del Barcode of Life (Ratnasingham & Hebert, 2007). Cada reacción de amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) consistió de un volumen final de 12.5 µl, el cual incluyó 6.25 µl de trehalosa al 10%, 2 µl de agua ultrapura, 1.25 µl de buffer 10X, 0.625 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.125 µl de cada primer (0.01 mM), 0.0625 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM), 0.06 µl de Platinum Taq polimerasa (5 U/µl) y 2 µl de ADN. Los primers utilizados para las PCRs fueron la versión M13-tailed del cocktail de peces C\_FishF1t1 y C\_FishR1t1 (Ivanova *et al.* 2007). Las reacciones de PCR fueron realizadas en placas de 96 pozos usando un termociclador Eppendorf™, aplicando el programa correspondiente a los primers utilizados: desnaturalización inicial del ADN a 94 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 52 °C por 30 segundos, temperatura de elongación a 72 °C por 1 minuto, y una temperatura para la extensión final de 72 °C por 10 minutos (Ivanova *et al.* 2007).

La verificación de la amplificación se realizó en geles de agarosa prefabricados (E-gel 2% agarosa de 96 pozos). En el E-gel se pusieron 16 µl de agua ddH<sub>2</sub>O y posteriormente 4 µl de producto de PCR en cada pozo. El E-gel se corrió durante 5 minutos. Los resultados de las electroforesis se observaron en un transiluminador con una lámpara ultravioleta y las imágenes se capturaron con una cámara digital.

La secuenciación se llevó a cabo en el Centro Canadiense para Códigos de Barra de ADN, en Guelph, Canadá, siguiendo la técnica propuesta por Ivanova (2007).

Una vez obtenidas las secuencias se editaron y alinearon con el programa SEQSCAPE V 2.1.1. (Applied Biosystems). Los detalles del primer, los archivos de rastreo y las secuencias están disponibles en el proyecto BACFI Bacalar Fish I, de la base de datos de Barcode of Life ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)).

### **4.3 Análisis de los datos**

Las secuencias obtenidas fueron subidas al sistema BOLD, en donde se compararon con la secuencia de referencia de todos los proyectos de peces existente en la base de datos. El sistema BOLD calcula distancias genéticas a través del modelo de dos parámetros de Kimura (K2P), este modelo matemático se usa para estimar el número de sustituciones de nucleótidos en una secuencia. El modelo K2P usa dos parámetros  $\alpha$  (transiciones) y  $\beta$  (transversiones), además asume que la frecuencia de los cuatro nucleótidos es la misma, sin embargo, las tasas de sustitución por transición y transversión son diferentes (Nei & Kumar, 2000). Cuando las secuencias obtenidas se alineaban con otras previamente identificadas con un porcentaje igual o mayor a 99% se pudo identificar a qué especie pertenece cada larva.

La biblioteca genética de referencia de larvas de peces del cenote Cocalitos se generó a partir del resultado de las comparaciones realizadas en el sistema Bold, como se menciona en párrafo anterior, por lo que las secuencias y códigos de barra tendrán el nombre correcto del taxón al que pertenecen y estarán contenidas en el proyecto BACFI Bacalar Fish I ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)).

Para la construcción del árbol de identificación se utilizó el método Neighbor Joining (disponible en el sistema BOLD), para proporcionar una representación gráfica del patrón de divergencia entre especies (Saitou & Nei, 1987).

Las larvas identificadas con el método tradicional y CBV se usaron de referencia para identificar por morfología y pigmentación el total de las larvas separadas que no fueron incluidas en los análisis y así determinar su identidad taxonómica.

Posteriormente se clasificaron por estadio del notocordio: preflexión (no flexionado), flexión (ligeramente flexionado) y posflexión (flexión completa), para conocer en qué etapa del desarrollo se encontraban.

Finalmente con los datos resultantes se creó una tabla comparativa de la riqueza tomada como el número de especies identificadas y el número de larvas capturadas por especie en las tres épocas de muestreo y otra con los resultados de separación de los estadios larvales.

## 5 Resultados

Durante el periodo de estudio se obtuvieron 6 muestras, de las cuales se separaron un total de 2369 larvas de peces, de este total se preclasificaron 112 larvas agrupadas en 17 morfotipos (cada morfotipo incluyó de 1 a 17 larvas). Cabe mencionar que las larvas seleccionadas para los CBV fueron solo a los meses de Abril, Junio y Julio, ya que las larvas del mes de Agosto y Diciembre no se observaron morfotipos diferentes a los de los meses anteriores (Tabla 1).

**Tabla 1.** Datos de larvas colectadas, enviadas a Barcode y número de secuencias exitosas del cenote Cocalitos, Bacalar, Quintana Roo.

Fecha	Número de larvas		
	colectadas	para identificación tradicional y Barcode	con secuencia positiva
02 de Abril	509	28	26
18 de Abril	125	37	31
28 de Junio	574	10	10
19 de Julio	616	37	34
20 de Agosto	9	0	
01 de Diciembre	536	0	
<b>Total</b>	<b>2369</b>	<b>112</b>	<b>101</b>

Por medio de taxonomía tradicional solo se identificaron tres larvas pertenecientes a una especie (*Bathygobius soporator*), los restantes 109 se determinaron de la siguiente manera: 28 a género (*Gobiosoma* sp., *Ctenogobius* sp.), 57 a familia (*Engraulidae* y *Gobiidae*) y 24 a orden (*Perciformes*) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados taxonómicos registrados en el cenote Cocalitos utilizando taxonomía tradicional y Código de Barras de la Vida.

Método	Orden	Familia	Género	Especie	Similaridad %
Taxonomía tradicional	Clupeiformes	Engraulidae (15)			
	Gobiiformes	Gobiidae (42)	Bathygobius	<i>Bathygobius soporator</i> (3)	
			Gobiosoma sp. (11)		
			Ctenogobius sp. (17)		
	Perciformes (24)				
Código de Barras	Clupeiformes	Clupeidae	Dorosoma	<i>Dorosoma petenense</i> (1)	100
		Engraulidae (11)			99.84
	Cyprinodontiformes	Cyprinodontidae	Cyprinodon	<i>Cyprinodon artifrons</i> (5)	99.84
	Gobiiformes	Gobiidae	Bathygobius	<i>Bathygobius soporator</i> (3)	99.84
			Lophogobius	<i>Lophogobius cyprinoides</i> (27)	99.85
			Gobiosoma	<i>Gobiosoma yucatanum</i> (32)	99.64
		Oxudercidae	Ctenogobius	<i>Ctenogobius fasciatus</i> (22)	99.54

Los resultados obtenidos con los Códigos de Barra de ADN, del total de muestras procesadas (112) 90 fueron identificadas a nivel de especie, 11 a nivel de familia y 11 no tuvieron secuencia.

La longitud de las secuencias varió entre 629-652 pb, excepto una, que solo obtuvo 171 pb (BACQ-26). En ninguna de las secuencias genéticas se observó inserciones, deleciones o codones de parada (stop codons).

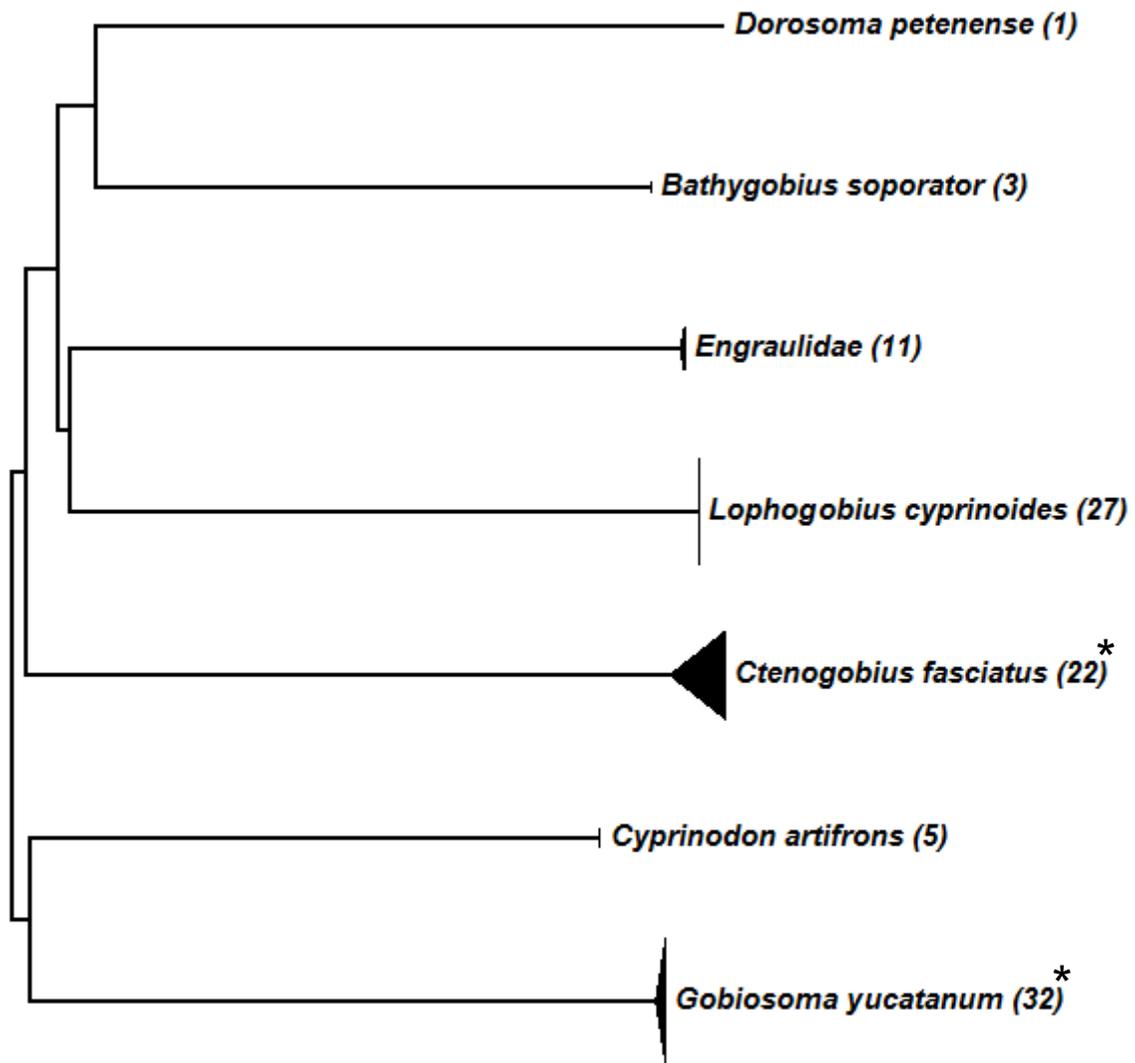
Las 101 secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de todos los organismos ya identificados que se encuentran en la base de datos de BOLD, la cual incluye la base de datos de los peces de Bacalar. Las secuencias que se unieron a secuencias con valores de similitud entre 99-100%, se consideraron co-específicas, es decir que pertenecen a un mismo taxón o especie (Ratnasingham & Hebert, 2007). Cabe hacer mención que a pesar de que BOLD consideró que la secuencia que tuvo 171 pb no cumplía el estándar de calidad como código de barra (Barcode Compliant), se pudo realizar su identificación. Con estos criterios se identificaron 6 especies que pertenecen a 6 géneros y 5 familias (Tabla 2).

Por medio del modelo K2P usado para comparar las secuencias, se obtuvo una distancia media intraespecífica entre especies de 0.14%, entre especies del mismo género 0% y entre géneros de la misma familia fue de 23.34%. Los valores de desviación estándar (S.E) en los tres niveles fueron de 0%, por lo que la confianza en la asignación de un espécimen a especie, género y familia es muy alta (Tabla 3).

Además, se generó un árbol de identificación que permitió visualizar el agrupamiento de cada uno de los ejemplares con su respectiva especie (Figura 3).

**Tabla 3.** Valores de divergencia genética calculados con el modelo Kimura de dos parámetros (K2P).

Comparación entre	Número de comparaciones	Distancia			S.E.
		Mínima (%)	Promedio (%)	Máxima (%)	
Especie	595	0	0.14	2.12	0
Género	0	0	0	0	0
Familia	81	23.06	23.34	23.60	0



**Figura 3.** Árbol construido con el método K2P y Neighbor-Joining que muestra las distancias entre familias, géneros y especies de 101 secuencias (números y figuras indican número de ejemplares secuenciados).

Tomando en cuenta los resultados de la técnica de CBV y analizando la morfología, se pudo identificar 10 de las 11 larvas que no tuvieron secuencia positiva, así como también de las 2257 larvas restantes se identificó el 93,5% (2111) y el 6.5% (146 larvas) no se lograron identificar por el mal estado que presentaban. (Tabla 4).

**Tabla 4.** Total de larvas capturadas e identificadas con ayuda de la técnica de Código de Barras de la Vida (CBV) en el cenote Cocalitos, Bacalar, Quintana Roo.

Taxón	Larvas identificadas		
	con secuencia	sin secuencia	no incluidas en análisis*
Clupeidae			
<i>Dorosoma petenense</i>	1	2	1
Engraulidae	11	1	57
Cyprinodontidae			
<i>Cyprinodon artifrons</i>	5		4
Gobiidae			
<i>Bathygobius soporator</i>	3		37
<i>Lophogobius cyprinoides</i>	27	1	964
<i>Gobiosoma yucatanum</i>	32	4	522
Oxudercidae			
<i>Ctenogobius fasciatus</i>	22	2	526
M.E.		1	146
Total	101	11	2257

M.E. Larvas en mal estado

\* Larvas restantes solo separadas

Del total de larvas capturadas 1208 fueron en la época de secas, 625 en lluvias y 536 en nortes. En cuanto a la riqueza específica cuatro especies: *Gobiosoma yucatanum*, *Bathygobius soporator*, *Lophogobius cyprinoides* y *Ctenogobius fasciatus* y la familia Engraulidae estuvieron presentes en las tres épocas muestreadas. La especie *Cyprinodon artifrons* se presentó tanto en secas como en lluvias y la especie *Dorosoma petenense* solo ocurrió en secas (Tabla 5).

Considerando todo el año, las larvas de *L. cyprinoides* fue las más abundante con 992 individuos seguido de *G. yucatanum* y *C. fasciatus* con 558 y 550 individuos; mientras que *D. petenense* solo se obtuvo 4 organismos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición y número de larvas de peces colectadas en las tres épocas de muestreo en el cenote Cocalitos, Bacalar, Quintana Roo.

Taxón/época	Secas		Lluvias		Nortes	Total
	Abril	Junio	Julio	Agosto	Diciembre	
Engraulidae	60	2		4	3	69
Clupeidae						
<i>Dorosoma petenense</i>	4					4
Cyprinodontidae						
<i>Cyprinodon artifrons</i>	3		6			9
Gobiidae						
<i>Gobiosoma yucatanum</i>	184	109	162	2	101	558
<i>Bathygobius soporator</i>	38	2				40
<i>Lophogobius cyprinoides</i>	187	386	175	1	243	992
Oxudercidae						
<i>Ctenogobius fasciatus</i>	117	66	193	2	172	550
	M.E.	41	9	80	17	147
	Total	634	574	616	536	2369

M.E. Larvas en mal estado

En cuanto a los resultados de la preclasificación de las larvas en sus tres estadios se encontró que, 300 larvas se encontraban en estadio de preflexión, 738 en etapa de flexión y 1184 en etapa de posflexión (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resultados del análisis de la etapa del desarrollo de los diferentes estadios de las larvas capturadas en el cenote Cocalitos, Bacalar, Quintana Roo.

Taxón/estadio	Preflexión	Flexión	Posflexión
Engraulidae		7	62
Clupeidae			
<i>Dorosoma petenense</i>	4		
Cyprinodontidae			
<i>Cyprinodon artifrons</i>			9
Gobiidae			
<i>Gobiosoma yucatanum</i>	72	216	270
<i>Bathygobius soporator</i>	38	1	1
<i>Lophogobius cyprinoides</i>	157	420	415
Oxudercidae			
<i>Ctenogobius fasciatus</i>	29	94	427
	Total	300	738
		738	1184

## 6 Discusión

### *Identificación tradicional*

Considerando los resultados obtenidos de la identificación con el método tradicional, solo se pudo identificar el 2.67% a nivel de especie de las 112 analizadas.

Solo una especie fue identificada: *Bathygobius soporator*, que pertenece a la familia Gobiidae, la cual ya había sido reportada para el área, pero en etapa de adulto (Schmitter-Soto, 1996). Los caracteres que permitieron reconocer a las larvas de esta especie fueron poseer pigmentos muy fuertes en el cuerpo, ésta es considerada la especie más pigmentada de cualquier otro góbido en el Centro Oeste del Océano Atlántico (Richards, 2005).

El resto de las larvas se identificaron a nivel de género de *Gobiosoma* sp. y *Ctenogobius* sp., ambas pertenecen a la familia Gobiidae y Oxudercidae respectivamente. En la revisión bibliográfica para el área no se encontraron estudios que hayan reportado adultos de estos géneros (Miller *et al.* 2009; Schmitter-Soto, 1996; Schmitter-Soto & Gamboa-Pérez, 1996). La razón más probable por la que no han sido registrados sus adultos en estudios previos es porque además de ser bentónicos, son de tamaño pequeño y se camuflan con el color del fondo, lo que hace difícil su colecta. Estos peces son conocidos como peces crípticos (Galván-Villa, 2011).

En el caso del género *Gobiosoma*, Benjamin-Victor en su guía fotográfica de larvas de peces arrecifales (coralreeffish.com), indica que en el Caribe ocurren 7 especies del género *Gobiosoma* (*Gobiosoma hildebrandi*, *G. schultzi*, *G. spes*, *G. spilotum*, *G. hemigymnum*, *G. grosvenori* y *G. yucatanum*). De los cuales solo *G. schultzi* y *G. yucatanum* pueden encontrarse en agua dulce (Froese & Pauly, 2018).

Por otra parte, Benjamin-Victor en su guía fotográfica menciona que el género *Ctenogobius* tiene especies que tienen una amplia distribución, ocupan diferentes

hábitats, y se pueden encontrar en aguas marinas, agua dulce y salobre. Este autor y Richards (2005) mencionan que los estadios larvales de las especies que pertenecen a los géneros *Gobiosoma* y *Ctenogobius*, son muy difíciles de identificar, ya que hay traslapes en sus conteos merísticos.

También cabe mencionar que con el método tradicional se identificaron larvas a nivel de familia Gobiidae y Engraulidae. Con respecto a la familia Gobiidae, este resultado se debió a lo pequeño de las larvas, ya que la mayoría estaban en estadio de preflexión y aún no desarrollaban ni radios ni espinas. La característica que ayudó en gran medida a la identificación de las larvas de familia Gobiidae fue al gran tamaño de la vejiga natatoria y la forma del intestino.

Por otro lado, la mayoría de las larvas identificadas como Engraulidae estaban en estadio de posflexión (anexo), es decir cerca de la transición de larva a juvenil, no obstante, debido a que las aletas de algunas estaban dañadas fue difícil el correcto conteo de sus radios. En la etapa de transición las larvas pierden algunos caracteres y adquieren los del adulto, entre las principales está el desarrollo de aletas, radios y espinas, caracteres importantes para su identificación (Kendall *et al.* 1981; Leis, 2014; Rodríguez *et al.* 2017). Para el área de estudio Schmitter-Soto (1996), reporta dos especies de la familia Engraulidae en estadio adulto: *Anchoa parva* y *Anchovia clupeioides*, por lo que cabe la posibilidad de que las larvas pertenezcan a alguna de las dos especies.

Por último las larvas identificadas a nivel de Orden (Perciformes), se debió a que todas las larvas presentaban algún grado de deterioro en su cuerpo y al tamaño muy pequeño de las larvas, lo que dificultó aún más su identificación a un menor nivel taxonómico.

### *Identificación por Código de Barra de la Vida*

El resultado en la obtención de secuencias para la identificación por este método fue de 95% de eficacia (101 secuencias positivas de un total de 112). Por lo que se puede considerar que el proceso de obtención y secuenciación del ADN fue exitoso. Este resultado es comparable con otros estudios que han obtenido un éxito de secuenciación similar por ejemplo (Hubert *et al.* 2010) obtuvo un 87% trabajando con larvas de peces de la familia Acanthuridae y Holocentridae, (Ko *et al.* 2013) 88% con 100 morfotipos de larvas de peces marinos y (Hubert *et al.*, 2008) 93% con peces de agua dulce, entre otros.

La razón por la cual no se obtuvieron 11 secuencias positivas se le puede atribuir a una mala fijación, a los cebadores utilizados o a la manipulación durante el proceso de toma de muestra, extracción, amplificación o secuenciación del ADN.

En este trabajo un ejemplar tuvo 171 pares de bases sin embargo esto no limitó su identificación a nivel específico (*Gobiosoma yucatanum*) ya que se utilizó la técnica de mini-barcode (cuando las secuencias son cortas: 100-300 pb). Su eficacia ha sido demostrada en otros estudios como el de (Dhar & Ghosh, 2017; Dubey *et al.* 2011; Elías-Gutiérrez *et al.* 2018; Hajibabaei *et al.*, 2006; Meusnier *et al.* 2008).

Como se ha dado a entender la media intraespecífica y congénica, se refiere al promedio de la distancia genética entre especies y al promedio de la distancia genética entre especies de un mismo género, respectivamente, ambos calculados con el método Kimura dos parámetros (K2P). La distancia media intraespecífica (0.14 %) y congénica (0%) obtenidas en este estudio son diferentes a otros trabajos publicados; por ejemplo, el estudio del ictioplancton dulceacuícola en el río Paranapanema se asemeja a la media intraespecífica (0.17%) del presente estudio (Frantine-Silva *et al.* 2015), pero difiere en la media congénica (11.93%). En lo que respecta a ambas medias los valores son más bajos que lo reportado en otros estudios sobre peces adultos dulceacuícolas, 1.3 % y 6.8% en el Río Paraná

(Pereira *et al.* 2013), 0.5 % y 10.6 % en el Río San Francisco (De Carvalho *et al.* 2011), ambos realizados en Brasil.

Con el método de Código de Barras de ADN de las 101 secuencias analizadas el 89.1 % se unieron con un valor de similitud mayor al 99.5% con secuencias de la biblioteca de BOLD, por consiguiente, se identificaron a nivel de especie y el 10.1% restante a nivel de familia. Las especies identificadas fueron: *Cyprinodon artifrons*, *Bathygobius soporator*, *Lophogobius cyprinoides*, *Dorosoma petenense*, *Gobiosoma yucatanum* y *Ctenogobius fasciatus*; y la familia Engraulidae. De estas seis especies, las tres primeras ya habían sido reportadas en estudios taxonómicos sobre peces adultos en la Laguna de Bacalar (Miller, 2009; Schmitter-Soto, 1996; Schmitter-Soto & Gamboa-Pérez, 1996). La última especie es nuevo registro para Bacalar lo cual ya fue publicado en el artículo “Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton” (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2018), en el cual se participó como coautor.

Con base a la revisión bibliográfica para la Laguna de Bacalar, no se encontraron reportes previos sobre la especie *Gobiosoma yucatanum*, por lo que se confirma como primer reporte para esta laguna.

En cuanto a los ejemplares recolectados que pertenecen a la familia Engraulidae, como ya se mencionó, hasta el momento las especies reportadas en la literatura para Bacalar son: *A. parva* y *A. clupeoides* (Schmitter-Soto, 1996), pero en la base de datos de BOLD solo existe *Anchoa lyolepis*, esta última en etapa de larva (Elías-Gutiérrez *et al.* 2018) a la cual no hubo coincidencia con ningún espécimen recolectado en este trabajo.

Por lo que cabe la posibilidad de que las larvas pertenezcan a una especie no registrada anteriormente o sea una nueva especie, esta situación se resolverá conforme se vayan agregando más secuencias de especies de la familia Engraulidae a la biblioteca de BOLD.

### *Comparación entre método tradicional y Código de Barras*

Si se compara la efectividad en la identificación a nivel de especie entre ambos métodos, los Código de Barras de la Vida fue mayor (89.1%) que la realizada por medio de la taxonomía tradicional (2.7%). Este resultado coincide con el de dos estudios que comparan ambos métodos como el estudio con larvas dulceacuícolas en el río Araguari y río Pará ubicados en el Sureste de Brasil (Becker *et al.* 2015) en el cual la identificación a nivel de especie por medio de CBV se obtuvo un 100% y 0% por taxonomía tradicional, y el segundo con larvas marinas en las aguas del Norte, Sur y Noroeste de Taiwan (Ko *et al.* 2013) 78.4 % por CBV y 13.5% por el método tradicional.

Los Códigos de Barra de la Vida o Barcode también ayudan al reconocimiento de nuevos registros o de especies crípticas (Ko *et al.* 2013), como sucedió en este caso con el góbido *Gobiosoma yucatanum*.

En este estudio se presenta por primera vez para el cenote “Cocalitos” en la Laguna de Bacalar (Tabla 5) un panorama sobre la composición y número de larvas por época (secas, lluvias y nortes). Al analizar la tabla se observa que la familia Gobiidae (*Gobiosoma yucatanum* y *Lophogobius cyprinoides*) y Oxudercidae (*Ctenogobius fasciatus*) tuvieron el mayor número de individuos en las tres épocas muestreadas. Estos resultados en cuanto al mayor número de ejemplares se asemejan a lo encontrado en el estudio realizado en varios puntos de la laguna de Bacalar, incluyendo el Cenote Cocalitos (Elías-Gutiérrez *et al.* 2018).

En cuanto a la temporalidad de ocurrencia de las larvas capturadas en el presente estudio (Tabla 5), la familia Engraulidae tuvo un pico mayor en la época de secas con 62 individuos, 4 en lluvias y 3 en nortes, por lo que se asume que en el mes de Abril hubo reproducción reciente y que esta ocurra casi en todo el año, al desconocer la especie a la cual pertenece es imposible comparar en bibliografía el periodo de reproducción, pero para las especie reportadas para la laguna de Bacalar, Miller (2009) menciona que la especie *Anchoa parva* en Colombia se

reproduce casi todo el año y *Anchoa clupeioides*, Schmitter-Soto (1996) reporta que se reproduce todo el año, y en cuanto a *Anchoa lyolepis* no se encontró datos sobre su periodo reproductivo.

En cuanto a la especie *Dorosoma petenense*, en el periodo de estudio solo se capturó 4 ejemplares y fue en época de secas, al respecto Schmitter-Soto (1996) menciona que esta especie es dulceacuícola, pero puede tolerar hasta 30 ‰ de salinidad y se reproduce la mayor parte del año, probablemente el arte de muestreo no fue el adecuado para capturar más las larvas de esta especie o en la laguna de Bacalar su reproducción solo se restringe a ciertos meses, por lo que se sugiere realizar más estudios.

*Cyprinodon artifrons* ocurrió con 3 y 6 ejemplares en secas y lluvias respectivamente, al respecto Schmitter-Soto (1996) menciona que los adultos de esta especie desovan de primavera a otoño, por lo que coincide con lo que se reporta en el presente estudio. La baja captura probablemente se deba al arte de muestreo empleado, al sitio u otra razón que deben ser estudiados.

No se encontró información sobre periodos de reproducción para *Gobiosoma yucatanum* y *Ctenogobius fasciatus*, y los resultados de ocurrencia para estas dos especies en este estudio fue en las tres épocas muestreadas, indicando que los adultos se reproducen durante todo el año en el área de muestreo.

*Bathygobius soporator* ocurrió solo en secas con 40 ejemplares, solo se encontró información sobre la reproducción de esta especie para Brasil (Frose & Pauly, 2018) en Septiembre y Octubre. Por lo que también se podría asumir que la reproducción de esta especie para el área del cenote Cocalitos se lleva a cabo en secas, pero de igual manera se sugiere más estudios para comprobarlo.

Por último, los resultados de ocurrencia en las tres épocas de muestreo para *Lophogobius cyprinoides* indica que los adultos se reproducen la mayor parte del año, al respecto Schmitter-Soto (1996) menciona que la reproducción de esta

especie es en el mes de Marzo y Junio, por lo que se amplía el periodo para tal comportamiento.

El estudio del desarrollo ontogénico de las larvas puede ayudar en gran medida al conocimiento sobre los sitios de refugio, alimentación, reproducción y desove, así como al posible impacto de desarrollos, la conservación, establecimiento de áreas protegidas y programas de manejo (Daga *et al.* 2009; Frantine-Silva *et al.* 2015; Hubert *et al.* 2015; Humphries & Lake, 2000; Matarese *et al.* 1989; Pegg *et al.* 2006; Valdez-Moreno *et al.* 2010).

El total de larvas identificadas fueron preclasificadas de acuerdo a su desarrollo ontogénico, por lo que la mayor cantidad de larvas pertenecieron al estadio de posflexión 1184 (53.3%), es decir cerca de la etapa de transición de larva a juvenil, 738 (33.2%) en estadio de flexión y 300 (13.50%) en estadio de preflexión (Tabla 6). La razón por la que se capturaron mayormente larvas en estadio de posflexión y seguidamente la flexión, probablemente se debe al grado de desarrollo de las aletas, lo que les permitió nadar con mayor facilidad hacia la fuente de luz, mientras que larvas en estadio de preflexión (se capturaron 300), éstas aún no desarrollan aletas que les ayuden en la locomoción. Al respecto Richards (2006), explica que las larvas con saco vitelino y en preflexión tienen aletas primordiales o membranas de las cuales se desarrollarán las aletas, estas membranas recorren desde la parte posterior de la cabeza, notocorda y hasta el ano, lo que les ayuda a realizar movimientos muy lentos y erráticos de locomoción, lo anterior puede explicar las bajas capturas en ese estadio.

Las larvas colectadas en estadio de preflexión también nos indican que son larvas de reciente eclosión, principalmente en las especies de la familia Gobiidae y Oxudercidae, asumiendo de esta manera que los adultos de estas especies tuvieron eventos reproductivos recientes.

En este estudio el 6.5 % (147) de las larvas se clasificaron como en mal estado (M.E.), es decir larvas deterioradas en alguna parte de su cuerpo. Este deterioro probablemente se deba a la depredación que se pueda llevar a cabo dentro de la

trampa de luz previo a la colecta, por lo que se sugiere hacer varias pre-colectas para minimizar la depredación sobre las larvas.

En el presente estudio también se da a conocer las principales características observadas durante la identificación morfológica y molecular, probablemente en un futuro se pueda generar un estudio en el cual se dé a conocer las descripciones larvales que así lo ameriten de algunas especies encontradas.

Algo importante de mencionar es que no hay reportes sobre conocimiento de estadios tempranos de *Lophogobius cyprinoides*, *Gobiosoma yucatanum*, *Ctenogobius fasciatus* y *Cyprinodon artifrons*, por lo que en este estudio se presentan las primeras descripciones básicas de las mismas.

Debido a la gran diversidad de caracteres morfológicos y el parecido que exhiben los estadios tempranos de vida de la mayoría de los peces óseos, y a la falta de descripciones larvales, es común hacer malas identificaciones en las larvas de peces, o en la mayoría de los casos solo llegar a una resolución taxonómica a nivel de familia o género; por lo que el uso de la técnica molecular del Código de Barras de la Vida o Barcode como herramienta de identificación resulta útil para los taxónomos del ictioplancton tanto costeros como dulceacuícolas. También es muy importante reconocer las debilidades que podría tener el Barcode, ya que mucho depende de las correctas identificaciones de las especies adultas contenidas en las bases de datos de referencia de BOLD (Ko *et al.* 2013; Victor *et al.* 2015).

## 7 Conclusiones

Este es el primer estudio de identificación de larvas de peces dulceacuícolas utilizando la taxonomía tradicional y Código de Barra de la Vida en el cenote “Cocalitos” dentro de la Laguna de Bacalar, en Quintana Roo y en México.

Con base en los resultados obtenidos se confirmó que la identificación tradicional sobre larvas de peces dulceacuícolas es limitada, ya que todavía se carece de claves taxonómicas especializadas y de estudios sobre descripciones larvales, por lo que es común que su identificación solo quede a nivel de familia y género.

El uso del método de Códigos de Barras resultó ser una herramienta útil para la identificación de larvas de peces dulceacuícolas, al discriminar a nivel de especie el 89.1%.

De las seis especies identificadas por Código de Barras uno es nuevo registro para la Laguna de Bacalar: *Gobiosoma yucatanum*. Por lo que este método también puede ayudar a acelerar el reconocimiento de especies aún no reconocidas.

Se contribuye por primera vez con la presentación fotográfica y de características morfológicas de los diferentes estadios larvales de las especies encontradas en el área de estudio.

Por primera vez se presenta para la región del Caribe Mexicano los tres estadios de desarrollo ontogénico de dos especies: *Gobiosoma yucatanum* y *Ctenogobius fasciatus*.

El cenote “Cocalitos” funciona como un sitio importante para refugio, crianza y reproducción de góbidos y otras familias, por lo que el uso de la taxonomía integrativa será útil para poder gestionar la protección del cenote y la Laguna de Bacalar.

Los altos números de larvas encontrados sugieren que el cenote “Cocalitos” es un área importante para la reproducción de estas especies. En este aspecto se

sugiere realizar estudios que se enfoquen en la distribución, abundancia, riqueza y otros índices, tanto espaciales como temporales, así como en el uso de la red estándar de arrastre y la medición de parámetros físico químicos del agua, con el objetivo de que se puedan aportar más datos que ayuden al conocimiento integral de las larvas de peces en la Laguna de Bacalar y sus cenotes.

Finalmente, los resultados de esta tesis son importantes ya que se da sustento para que se considere al cenote “Cocalitos” y a la laguna de Bacalar como lugares importantes para su cuidado y conservación y así preservar su biodiversidad que es patrimonio natural del estado de Quintana Roo y de nuestro país.

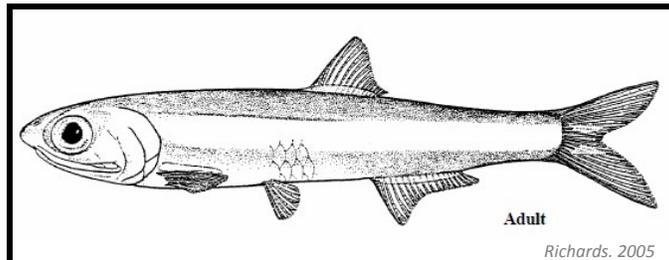
## 8 Anexos

A continuación, se presentan las especies de larvas con su clasificación taxonómica, principales características morfológicas y merísticas, secuencia y Código de Barras de la Vida.

### Engraulidae

#### Clasificación taxonómica

Reino: Animalia  
Phyllum: Chordata  
Clase: Actinopterygii  
Orden: Clupeiformes  
Familia: Engraulidae  
Género: No identificado  
Especie: No identificado



#### Diferentes estadios de desarrollo identificados:

##### Estadio posflexión (Foto 1)

Características merísticas: no tiene primera aleta dorsal (D1), segunda aleta dorsal (D2) 13-15, Aleta anal (A) 38-40, Aleta caudal (C) 21-22 y 38-40 miómeros. Los radios de la aleta pectoral (P1) y pélvica (P2) no están bien desarrollados.

Forma del cuerpo: alargado y con ojos prominentes.

Pigmentación: sin pigmentos en la cabeza y laterales del cuerpo, melanóforos elongados en la región ventral y anterior a la aleta pélvica (región gular), pocos melanóforos a lo largo del margen superior del intestino, en la base de la aleta anal, ventral del pedúnculo caudal y en la base de la aleta caudal. Melanóforo interno en la base del notocordo.

Forma del intestino: Alargado con estrías verticales.

Mes de colecta: Abril y Junio.



**Foto 1. Características principales estadio posflexión.**

### **Secuencia del gen COI**

GAGCAGGAATGGTGGGAACAGCACTCAGCCTCCTTATTCGAGCAGAATTAAG  
 TCAACCAGGAGCACTTCTGGGGGACGACCAGATTTATAATGTAATCGTAACCG  
 CCCACGCATTCGTAATAATCTTTTTTATGGTGATGCCTATTATAATTGGCGGCT  
 TCGGGAATTGACTAGTCCCTCTTATACTAGGAGCCCCAGACATGGCATTCCCT  
 CGAATGAACAACATGAGCTTTTGACTCCTTCCCCCCTCATTCTGCTTCTCCT  
 GGCATCATCTGGGGTTGAAGCCGGGGCTGGGACAGGGTGGACAGTTTACCC  
 CCCTCTAGCAGGCAACCTTGCCCATGCCGGAGCATCGGTAGATTTGACAATC  
 TTTTCTCTTCACTTAGCAGGAATCTCATCAATTTTAGGTGCCATTAATTTTATTA  
 CCACCATCATCAATATAAAACCACCTGCCATTTACAATACCAGACACCTTTAT  
 TTGTCTGAGCTGTGCTTATTACAGCAGTACTTTTACTGCTTTTCGCTCCCCGTTT  
 TAGCTGCTGGGATTACTATGCTTCTTACAGACCGAAACCTTAACACCACCTTTCT  
 TTGATCCAGCAGGGGGAGGAGACCCGATTCTTTACCAACACCTA

### **Código de barras**



**BIN:**

BOLD:ACV0719

## ***Dorosoma petenense***

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Clupeiformes

Familia: Clupeidae

Género: *Dorosoma*

Especie: *Dorosoma petenense* ((Günther, 1867))

Nombre común: sardina maya.



### **Diferentes estadios de desarrollo identificados:**

#### **Estadio preflexión (Foto 2)**

Características merísticas: radios de la aleta pectoral poco desarrollados, aletas pélvicas y caudal no desarrollado, y solo se logró un conteo de 35 miómeros debido a su estadio.

Forma del cuerpo: alargado y con ojos prominentes.

Pigmentación: sin pigmentos en la cabeza y laterales del cuerpo, 2 melanóforos elongados debajo de la aleta pectoral, varios melanóforos elongados en el margen superior del intestino anterior y en el margen ventral del mismo en su parte posterior y margen superior e inferior del notocordio.

Forma del intestino: Alargado y cerca del notocordio.

Mes de colecta: Abril.



**Foto 2. Características principales estadio preflexión.**

### **Secuencia del gen COI**

```

CCTTTATCTAGTATTTGGTGCCTGAGCGGGGATAGTAGGGACTGCCCTAAGC
CTCCTAATTCGAGCAGAATTAAGCCAACCTGGAGCACTTCTTGAGATGACCA
GATCTACAATGTTATCGTTACAGCACATGCCTTCGTAATGATTTTCTTCATAGT
AATGCCAATCCTGATTGGAGGATTTGGAAACTGGCTTGTCCCTTTAATGATCG
GGGCACCCGACATGGCATTTCGCCGAATAAATAATATGAGCTTTTGACTCCTG
CCCCCTCTTTCCTTCTTCTTCTGGCCTCCTCGGGGGTAGAAGCCGGGGCGG
GGACAGGATGAACAGTATACCCCCCTTTGTCAGGTAATCTAGCCCACGCCGG
AGCATCCGTCGATCTAACTATTTTTTCACTACATCTTGCAGGTATCTCATCTAT
TCTCGGGGCAATCAATTTTATTACTACAATTATTAACATGAAACCCCCTGCAAT
CTCACAGTACCAGACACCCCTGTTTGTCTGATCAGTTCTAGTAACTGCCGTCC
TCCTTCTCCTGTCCCTTCCAGTTCTGGCCGCCGGAATTACTATGCTACTTACA
GACCGAAACCTTAACACAACCTTTCTTTGACCCAGCAGGTGGAGGAGACCCAA
TTCTGTACCAACACCTA

```

### **Código de barras**



**BIN:**

**BOLD:**AAC3463

## ***Bathygobius soporator***

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phyllum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Gobiiformes

Familia: Gobiidae

Género: Bathygobius

Especie: *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837)

Nombre común: llamado gobio con aleta de fleco.



### **Diferentes estadios de desarrollo identificados:**

#### **Estadio preflexión (Foto 3 a)**

Características merísticas: los ejemplares colectados tienen la aleta pectoral poco desarrollada, aleta caudal y aletas pélvicas no desarrolladas.

Forma del cuerpo: corto y con ojos grandes.

Pigmentación: melanóforos prominentes en el margen superior de la vejiga natatoria, en serie lineal en el margen superior del intestino y ventral de la cola y dos melanóforos ventrales del saco vitelino.

Forma del intestino: corto con presencia de saco vitelino.

Mes de colecta: Abril.

#### **Estadio posflexión (Foto 3 b)**

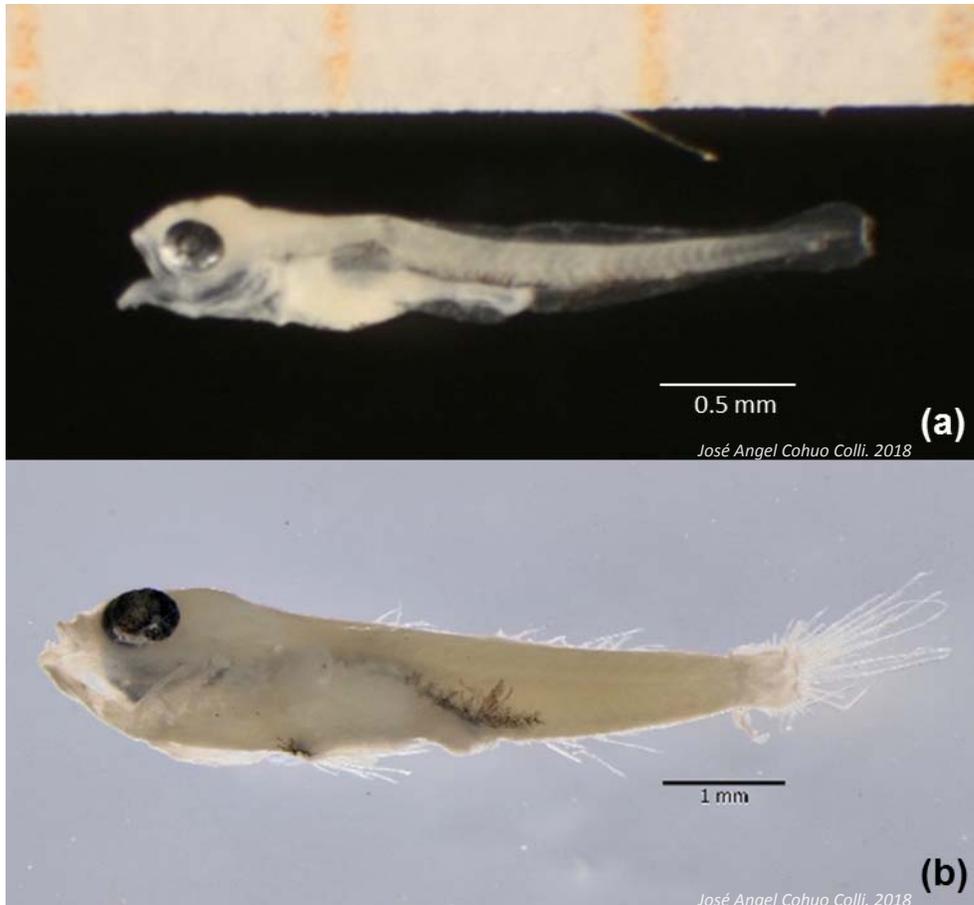
Características merísticas: D1-VI, D2-10, A-9, P1 18-19, P2-dañada y A-dañada.

Forma del cuerpo: corto, robusto y cabeza grande.

Pigmentos y melanóforos: serie de melanóforos prominentes que van de la cavidad interna superior del estómago hasta el ano. Serie lineal de melanóforos ramificados prominentes que recorre desde el intestino hasta inicio de la aleta anal. Un melanóforo en la base de la aleta pélvica.

Forma del intestino: Corto.

Mes de colecta: Junio.



**Foto 3. Características principales estadio preflexión (a) y posflexión (b).**

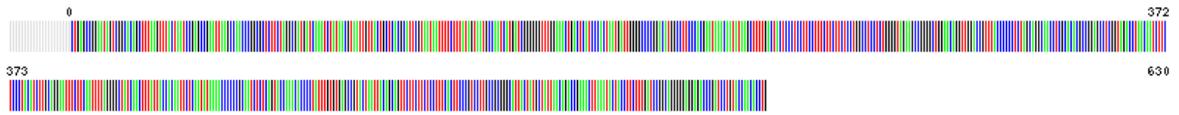
### **Secuencia del gen COI**

```

CTGAGCCGGAATAGTCGGCACAGCTTTAAGTTTACTAATCCGAGCCGAATTAA
GCCAACCCGGCGCTCTTCTAGGCGATGATCAAATCTATAACGTAATTGTTACT
GCTCACGCATTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATCATGATCGGGGG
GTTTGGAAACTGACTCATCCCACTAATGATTGGGGCCCCGGACATGGCCTTC
CCACGAATAAACAATATAAGCTTTTGACTACTCCCTCCTTCCTTTCTTCTTCTC
CTGGCCTCCTCTGGGGTAGAAGCCGGGGCTGGAACAGGTTGGACCGTTTAC
CCCCCTCTAGCAGGCAACCTCGCACACGCCGGAGCCTCGGTAGACCTAACAA
TCTTCTCCCTACATCTTGCAGGAATTTCTTCAATTTTAGGGGCTATCAACTTTA
TTACCACAATTCTCAATATAAAACCCCCGCAATCTCTCAGTACCAAACACCC
CTATTTGTGTGAGCCGTAATAATTACAGCAGTTCTTCTTCTCCTTTCACTTCCC
GTCCTTGCCGCGGGCATTACTATGCTATTAACAGACCGAACTTAAATACTAC
CTTCTTTGATCCGGCAGGGGGAGGAGACCCGATCCTGTACCAACACCTG

```

## Código de barras



**BIN:**

BOLD:AAA7195

## **Gobiosoma yucatanum**

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phyllum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Gobiiformes

Familia: Gobiidae

Género: Gobiosoma

Especie: *Gobiosoma yucatanum* Dawson, 1971

Nombre común: conocido como góbido de Yucatán, es el primer registro para la laguna de Bacalar.



### **Diferentes estadios de desarrollo identificados:**

#### **Estadio preflexión (Foto 4 a)**

Características merísticas: P1-poco desarrollado, D1, D2, P2 y C no desarrollados. Conteo de 25 miómeros.

Forma del cuerpo: alargado con ojos grandes.

Pigmentación: sin pigmentos en los laterales del cuerpo, serie de melanóforos en el margen superior de la vejiga natatoria.

Forma del intestino: alargado con presencia de remanentes de saco vitelino y prominente vejiga natatoria.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio y Agosto.

#### **Estadio flexión (Foto 4 b)**

Características merísticas: P1-poco desarrollado, D1, D2, P2, A y C en desarrollo y conteo de 26 miómeros.

Forma del cuerpo: alargado y ojos grandes.

Pigmentación: sin pigmentos en los laterales del cuerpo; serie de melanóforos en el margen superior de la vejiga natatoria, en la base de la aleta anal y pedúnculo caudal.

Forma del intestino: alargado y vejiga natatoria visible.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio, Agosto y Diciembre.

### **Estadio posflexión (Foto 4 c)**

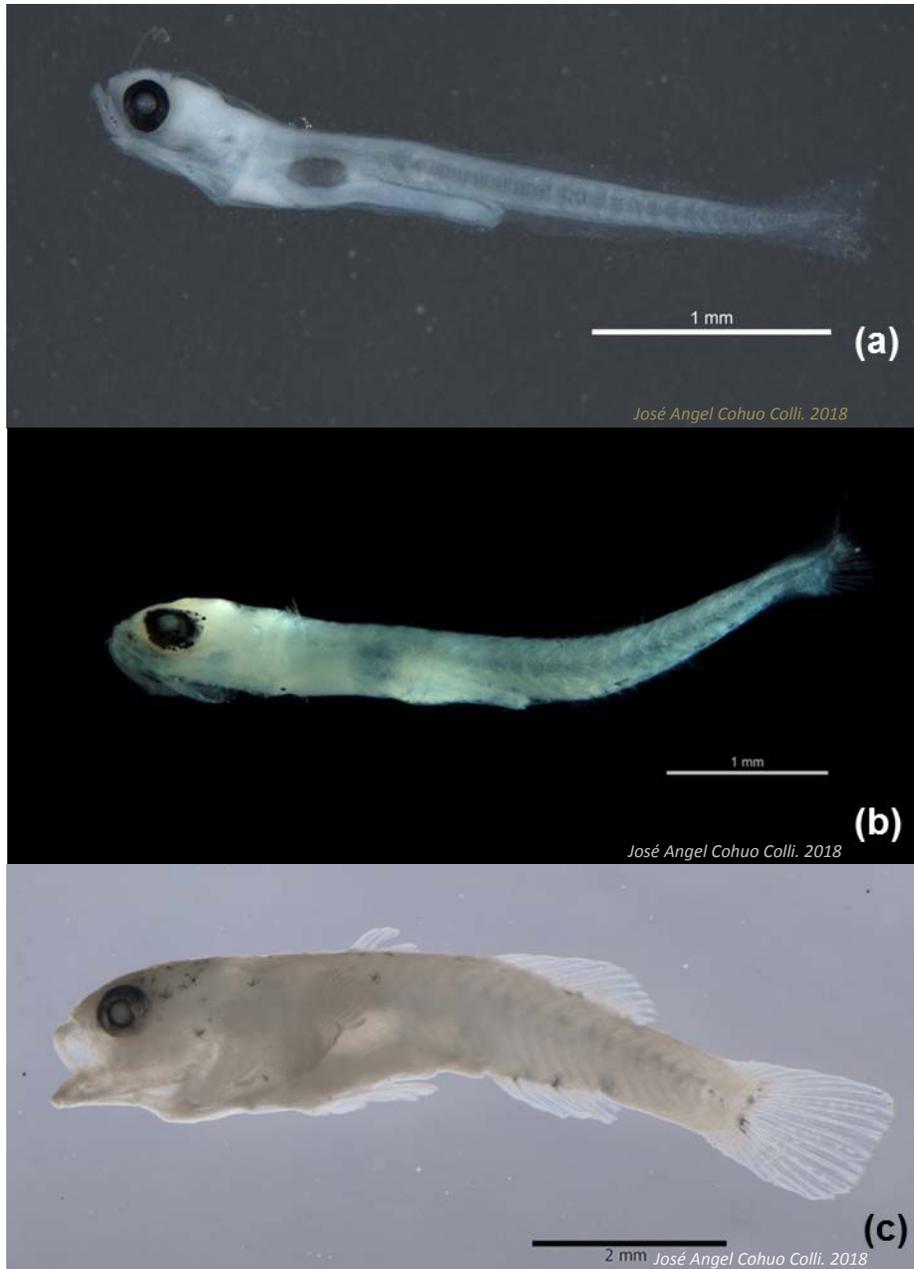
Características merísticas: D1-VII, D2-11, A-10, P1 16-17, P2- y C-16.

Pigmentación: melanóforos en la cabeza, base de las aletas dorsales y pélvicas, en la base de la aleta anal y caudal, en ésta última en serie paralelo. Melanóforos internos en la parte superior de las vértebras y vejiga natatoria.

Forma del intestino: corto y con la vejiga natatoria visible.

Forma del cuerpo: corto y robusto.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio y Diciembre.

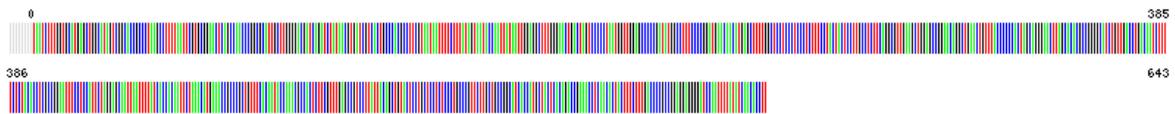


**Foto 4. Características principales estadio preflexión (a), flexión (b) y posflexión (c).**

## Secuencia del gen COI

TAATCTTTGGTGCATGAGCTGGCATAGTCGGCACCGCCCTAAGCCTTTTAATT  
CGTGCGGAACTCAGCCAACCCGGCGCATTGCTTGGGGACGATCAGATCTATA  
ACGTGATCGTCACTGCCACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCAA  
TTATAATTGGAGGCTTTGGGAACTGACTAGTCCCCCTAATGGTTGGAGCCCCC  
GATATGGCCTTTCCCCGGATGAACAACATGAGCTTTTGGCTCCTCCCTCCCTC  
TTTCTACTACTCCTTGCCTCTTCAGGCGTTGAAGCTGGAGCCGGAACAGGC  
TGAAGTGTTTACCCCCACTAGCAGGGAAGTTAGCACACGCCGGGGCATCTG  
TTGACCTGACAATCTTTTCTCTACACCTCGCCGGAATTTCTCCATTCTAGGA  
GCAATTAATTTATCACCACAATTCTAAACATGAAACCGCCCGCTGTTTCACAA  
TACCAAACGCCACTCTTCGTTTGAGCCGTCCTTATTACAGCTGTACTCCTGCT  
CCTCTCCCTGCCCGTTCTTGCTGCCGGCATCACCATGCTACTCACAGACCGA  
AACCTCAACACTACTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGGGATCCAATTTTATA  
TCAACACCTT

## Código de barras



## BIN:

BOLD:ACV0831

## **Ctenogobius fasciatus**

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phyllum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Gobiiformess

Familia: Oxudercidae

Género: Ctenogobius

Especie: *Ctenogobius fasciatus* (Gill, 1858)

Nombre común: conocido como gobio pintado.



### **Diferentes estadios de desarrollo identificados:**

#### **Estadio preflexión (Foto 5 a)**

Características merísticas: P1-poco desarrollado, D1, D2, P2 y C no desarrollados y conteo de 25 miómeros.

Forma del cuerpo: Alargado.

Pigmentación: sin pigmentos en los laterales del cuerpo, serie de melanóforos en el margen superior y posterior de la vejiga natatoria.

Forma del intestino: alargado con presencia de remanentes de saco vitelino y prominente vejiga natatoria.

Mes de colecta: Abril y Junio.

#### **Estadio flexión (Foto 5 b)**

Características merísticas: P1-poco desarrollado, D1, D2, P2, A y C en desarrollo y conteo de 26 miómeros.

Forma del cuerpo: alargado y ojos grandes.

Pigmentación: sin pigmentos ni melanóforos en los laterales del cuerpo, serie de melanóforos en el margen superior y posterior de la vejiga natatoria.

Forma del intestino: alargado y vejiga natatoria visible.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio, Agosto y Diciembre.

**Estadio posflexión (Foto 5 c)**

Características merísticas: D1-VI, D2 11-12, A 11-12, P1 14-17, P2 I,5 y C15.

Conteo de 26 miómeros.

Forma del cuerpo: alargado.

Pigmentación: melanóforos en la parte dorsal y posterior de la vejiga natatoria, melanóforos en la base de la aleta anal y parte ventral del pedúnculo caudal.

Forma del intestino: alargado y con vejiga natatoria prominente.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio y Diciembre.

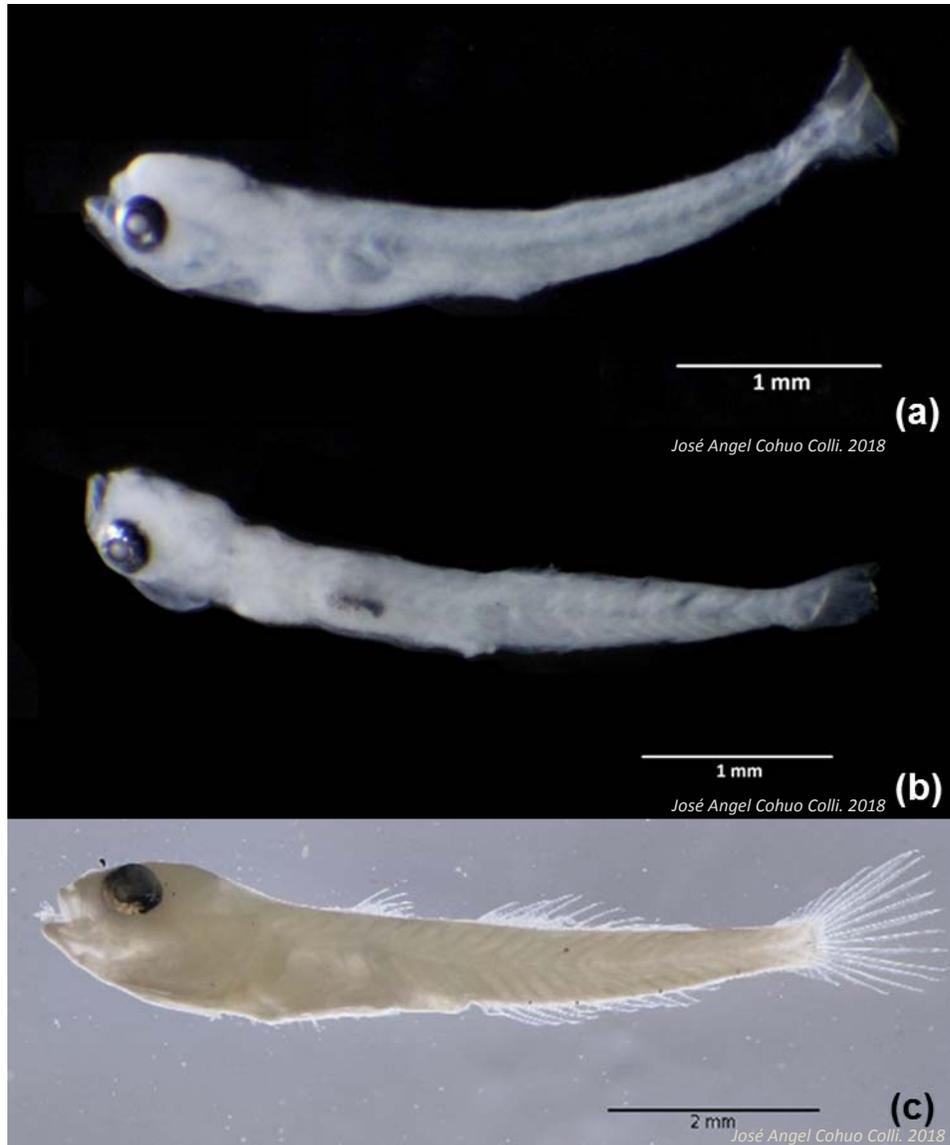
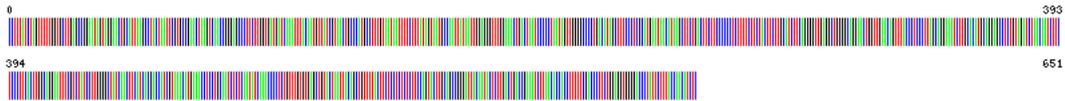


Foto 5. Características principales estadio preflexión (a), flexión (b) y posflexión (c).

## Secuencia del gen COI

CCTTTATCTAGTTTTTGGTGCTTGAGCCGGAATAGTAGGAACTGCATTAAGCCTACTA  
ATTCGTGCCGAACTAAGTCAACCGGGAGCCCTTCTTGGTGATGATCAAATTTACAATG  
TTATCGTAACTGCCCATGCCTTTGTAATAATTTCTTTATAGTAATGCCAATTATAATTG  
GAGGGTTTGGAACTGACTAATCCCCCTAATAGTTGGGGCCCCTGACATAGCTTTCC  
CTCGCATGAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCCCCTCTTTTCTTCTACTTCTTGCA  
TCTTCAGGGGTTGAGGCTGGGGCAGGAACTGGTTGAACAGTTTACCCTCCCTTAGCA  
GGAAATCTTGACATGCAGGAGCCTCTGTAGATCTAACAATCTTCTCCCTTCACTTGG  
CAGGAATTCGTCTATCCTTGGGGCTATCAACTTCATCACGACCATCGTAAACATGAA  
ACCTCCTGCAATCTCTCAATATCAAACCCTCTGTTTGTGTGAGCTGACTAATTACAG  
CTGTTTTACTTCTCCTCTCTCTTCCAGTACTTGCAGCCGGGATTACAATACTCTTGACT  
GACCGAAATCTTAACACCACCTTTTTCGACCCTTCTGGAGGTGGGGACCCTATTCTTT  
ACCAACATCTC

## Código de barras



**BIN:**

BOLD:AAE7730

## ***Lophogobius cyprinoides***

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phyllum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Gobiiformess

Familia: Gobiidae

Género: Lophogobius

Especie: *Lophogobius cyprinoides* (Pallas, 1770)

Nombre común: conocido como góbido de cresta o gallo.



### **Diferentes estadios de desarrollo identificados:**

#### **Estadio preflexión (Foto 6 a)**

Características merísticas: D1, D2, P1, P2, A y C poco desarrollados y conteo de 24-25 miómeros.

Forma del cuerpo: corto y con ojos grandes.

Pigmentación: sin pigmentos en los laterales del cuerpo, un melanóforo en el margen superior de la vejiga natatoria y serie de melanóforos elongados en la base de la aleta anal.

Forma del intestino: corto y prominente vejiga natatoria.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio y Diciembre.

#### **Estadio flexión (Foto 6 b)**

Características merísticas: D1, D2, P1, P2, A y C en desarrollo. Conteo de 24-25 miómeros.

Forma del cuerpo: alargado y ojos grandes.

Pigmentación: sin pigmentos en los laterales del cuerpo, serie de melanóforos en el margen superior de la vejiga natatoria, en la base de la aleta anal y pedúnculo caudal. Un melanóforo en la zona pélvica.

Forma del intestino: alargado y vejiga natatoria visible.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio y Diciembre.

### **Estadio Posflexión (Foto 6 c)**

Características merísticas: D1-VI, D2-10, P1 17-18, P2-12, A-9 y C-14.

Pigmentación: melanóforos en la cabeza, base de la primera aleta dorsal, aleta pélvica y aleta anal. Melanóforos en la base de los radios inferiores de la aleta caudal y en las tres primeras espinas de la aleta dorsal. Melanóforos internos en el margen superior de la vejiga natatoria.

Forma del intestino: corto y con la vejiga natatoria visible.

Forma del cuerpo: corto y robusto.

Mes de colecta: Abril, Junio, Julio, Agosto y Diciembre.

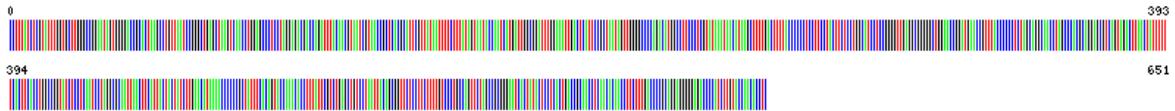


**Foto 6. Características principales estadio preflexión (a), flexión (b) y posflexión (c).**

## Secuencia del gen COI

CCTTTATCTCGTATTTGGTGCTTGGGCCGGAATAGTGGGGACCGCACTAAGC  
CTGTTAATCCGGGCTGAGCTAAGTCAACCTGGAGCCCTCCTAGGAGACGACC  
AGATTTACAACGTAATCGTAACCGCTCACGCATTCTGTTATAATTTTCTTTATAG  
TAATACCAATCATGATTGGCGGATTTGGAAATTGACTCATTCCGCTAATAGTTG  
GGGCCCCAGACATGGCCTTCCCTCGTATAAATAACATAAGCTTTTGACTTTTA  
CCCCCTCCTTCTACTTCTCCTGGCATCCTCCGGGGTTGAGGCGGGGGCTG  
GAACCGGATGAACCGTTTACCCCCCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCACGCAGG  
AGCGTCAGTAGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTGGCCGGTATCTCCTCAAT  
CCTAGGCGCAATTAACCTTACTACTATCTTGAACATAAAACCCCCGCTAT  
TTCACAGTACCAAACACCTTTATTCGTCTGAGCTGTCCTAATTACAGCGGTTCT  
CCTTCTTTTGTCCCTGCCAGTTCTAGCCGCGGGAATCACTATACTCCTCACTG  
ACCGCAACCTCAACACAACCTTCTTTGACCCCGCAGGAGGGGGAGACCCCAT  
CTTGTACCAACACCTC

## Código de barras



## BIN:

BOLD:AAB6671

## ***Cyprinodon artifrons***

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phyllum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Cyprinodontiformes

Familia: Cyprinodontidae

Género: *Cyprinodon*

Especie: *Cyprinodon artifrons* (Hubbs, 1936)

Nombre común: conocido como cachorro.



### **Diferentes estadios de desarrollo identificados:**

#### **Estadio posflexión (Foto 7)**

Características merísticas: P1 8-9, C-8, D1, P2 y A no desarrollados. Conteo de 23-24 miómeros,

Pigmentación: melanóforos en la media lateral y dorsal del cuerpo, más concentrados y densos en la cabeza. Un melanóforo grande y ramificado que inicia en la parte ventral del estómago y finaliza al final del intestino. Melanóforos en la base de los radios inferiores de la aleta caudal.

Forma del intestino: corto.

Forma del cuerpo: corto y robusto.

Mes de colecta: Abril y Julio.

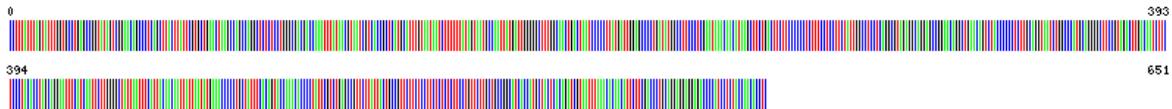


**Foto 7. Características principales estadio posflexión.**

### **Secuencia del gen COI**

CCTTTATTTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGTATAGTCGGAACAGCCCTCAGCT  
TACTTATTCGTGCTGAACTAAGCCAGCCAGGCTCTCTCCTGGGCGACGACCA  
AATTTATAACGTAATCGTCACCGCTCATGCATTTGTAATAATCTTTTTTATAGTA  
ATGCCAATTATGATTGGGGGCTTTGGCAACTGACTAATCCCCCTTATGATTGG  
AGCCCCTGATATGGCCTTCCCTCGAATAAACAACATAAGCTTCTGACTTCTTC  
CCCCCTCTTTCCTCCTTCTATTGGCCTCCTCAGGCGTAGAGGCAGGAGCCGG  
AACAGGCTGAACAGTCTACCCCCCTCTTGCAGGTAATCTGGCCCATGCAGGG  
GCTTCCGTAGACTTGACAATCTTCTCCCTACACCTAGCAGGAATTCATCAATT  
CTTGGGGCTATTAATTTATTACAACAATTATTAATATGAAACCCCCTGCTATTT  
CACAGTACCAAACACCCCTATTCGTCTGAGCCGTTCTTATTACTGCCGTTCTT  
CTCCTTCTCTCTTCTGTTCTTGCTGCCGGCATCACCATGCTACTCACAGA  
TCGTAATTTAAACACAACATTCTTCGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCCATCC  
TCTACCAACACCTC

### **Código de barras**



**BIN:**

BOLD:AAA8182

## 9 Literatura consultada

- Álvarez-Cadena, J. N., Ordóñez-López, U., Almaral-Mendivil, A. R., Ornelas-Roa, M., & Uicab-Sabido, A. (2007). Larvas de peces del litoral arrecifal del norte de Quintana Roo, Mar Caribe de México. Fish larvae from the north littoral reef of Quintana Roo , Mexican Caribbean Sea. *Hidrobiológica*, 17(2), 139–150.
- Baldwin, C. C., & Johnson, G. D. (2014). Connectivity across the Caribbean Sea: DNA Barcoding and Morphology Unite an Enigmatic Fish Larva from the Florida Straits with a New Species of Sea Bass from Deep Reefs off Curaçao. *PLoS ONE*, 9(5), e97661. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097661>
- Becker, R. A., Sales, N. G., Santos, G. M., Santos, G. B., & Carvalho, D. C. (2015). DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco. *Journal of Fish Biology*, 87(1), 159–168. <http://doi.org/10.1111/jfb.12707>
- Daga, V. S., Gogola, T. M., Sanches, P. V., Baumgartner, G., Baumgartner, D., Piana, P. A., ... Delariva, R. L. (2009). Fish larvae assemblages in two floodplain lakes with different degrees of connection to the Parana River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 7(3), 429–438. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252009000300010>
- De Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C., & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: The case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22(SUPPL. 1), 80–86. <http://doi.org/10.3109/19401736.2011.588214>
- Dhar, B., & Ghosh, S. K. (2017). Mini-DNA barcode in identification of the ornamental fish: A case study from Northeast India. *Gene*, 627, 248–254. <http://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.06.043>
- Dubey, B., Meganathan, P. R., & Haque, I. (2011). DNA mini-barcoding: An approach for forensic identification of some endangered Indian snake species. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 181–184. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.03.001>
- Elías-Gutiérrez, M., Valdez-Moreno, M., Topan, J., Young, M. R., & Cohuo-Colli, J. A. (2018). Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecology and Evolution*, 8(5), 3002–3018. <http://doi.org/10.1002/ece3.3742>
- Espinosa-Pérez, H. (2014). Biodiversidad de peces en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 450–459. <http://doi.org/10.7550/rmb.32264>
- Fisher, R., Bellwood, D. R., & Job, S. D. (2000). Development of swimming abilities in reef fish larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 202(1997), 163–173. <http://doi.org/10.3354/meps202163>

- Franco-Gordo, C., Suárez-Morales, E., & Godinez-Dominguez, E. (2001). A seasonal survey of the fish larvae community of the central Pacific coast of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 68(3), 381–396.
- Frantine-Silva, W., Sofia, S. H., Orsi, M. L., & Almeida, F. S. (2015). DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1226–1237. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12385>
- Froese, R., & D. Pauly. (2018). FishBase. Retrieved August 12, 2018, from [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (06/2018)
- Fuiman, L. A. (1983). Growth gradients in fish larvae. *Journal of Fish Biology*, 23(1), 117–123. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02886.x>
- Fujimura, K., & Okada, N. (2007). Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development Growth and Differentiation*, 49(4), 301–324. <http://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00926.x>
- Galván-villa, C. M. (2011). Peces crípticos: componente importante de los sistemas arrecifales. *CONABIO. Biodiversitas*, 97, 1–5.
- Gamboa-Pérez, H. C. & Schmitter-Soto, J. J. (1999). Distribution of cichlid fishes in the littoral of lake Bacalar. *Environmental Biology of Fishes*, 54(1), 35–43.
- Gischler, E., Golubic, S., Gibson, M. A., Oschmann, W., & Hudson, J. H. (2011). Microbial mats and microbialites in the freshwater Laguna Bacalar, Yucatan Peninsula, Mexico. *Lecture Notes in Earth Sciences*, 131, 187–205. [http://doi.org/10.1007/978-3-642-10415-2\\_13](http://doi.org/10.1007/978-3-642-10415-2_13)
- Green Ruiz, Y. A. (1993). Composición y abundancia de las larvas de peces durante un ciclo anual en la Boca de Agua Dulce Laguna de Huizache Caimanero, Sin., México. Instituto Politecnico Nacional. Retrieved from <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3290/14.pdf?sequence=1>
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., & Hebert, P. D. N. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 959–964. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x>
- Houde, E. D. (1994). Houde, E. D. (1994). Differences between marine and freshwater fish larvae: Implications for recruitment. *ICES Journal of Marine Science*, 51(1), 91–97. <http://doi.org/10.1006/jmsc.1994.1008>Differences between marine and freshwater fish larvae: Implication. *ICES Journal of Marine Science*, 51(1), 91–97. <http://doi.org/10.1006/jmsc.1994.1008>
- Hubert, N., Delrieu-Trottin, E., Irisson, J. O., Meyer, C., & Planes, S. (2010). Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and*

- Evolution*, 55(3), 1195–1203. <http://doi.org/10.1016/j.ymprev.2010.02.023>
- Hubert, N., Espiau, B., Meyer, C., & Planes, S. (2015). Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 57–67. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12293>
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., BurrIDGE, M., ... Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE*, 3(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
- Humphries, P., & Lake, P. S. (2000). Fish larvae and the management of regulated rivers. *Regulated Rivers: Research & Management*, 16(5), 421–432. [http://doi.org/10.1002/1099-1646\(200009/10\)16:5<421::AID-RRR594>3.0.CO;2-4](http://doi.org/10.1002/1099-1646(200009/10)16:5<421::AID-RRR594>3.0.CO;2-4)
- Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., & Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 998–1002. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x>
- Jones, D. (2006). Design, construction, and use of a new light trap for sampling larval coral reef fishes (NOAA technical memorandum NMFS-SEFSC-544), (October), 1–34. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Design,+construction,+and+use+of+a+new+light+trap+for+sampling+larval+coral+reef+fishes#0>
- Kendall, A. W., Ahlstrom, E. H., & Moser, H. G. (1981). Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *Ontogeny and Systematics of Fishes*, 1–12.
- Ko, H. L., Wang, Y. T., Chiu, T. S., Lee, M. A., Leu, M. Y., Chang, K. Z., ... Shao, K. T. (2013). Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 8(1), 3–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0053451>
- Leis, J. M. (2014). Taxonomy and systematics of larval Indo-Pacific fishes: a review of progress since 1981. *Ichthyological Research*, 62(1), 9–28. <http://doi.org/10.1007/s10228-014-0426-7>
- Luo, A., Zhang, A., Ho, S. Y. W., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., ... Zhu, C. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: A case study using eutherian mammals. *BMC Genomics*, 12. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-12-84>
- Lyczkowski-Shultz, J., Ruple, D. L., Richardson, S. L., & Cowan, J. H. (1990). Distribution of fish larvae relative to time and tide in a Gulf of Shallow

estuarine embayments in the northern Gulf of Mexico such as Mississippi Sound are known to be important finfish and shellfish nursery areas for the and Chuang , 1983 ; Schroeder, 46(3), 563–577.

Martínez-Palacios, C., Ríos-Durán, M. G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., & Ross, L. G. (2002). Avances en el Cultivo del Pescado Blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Avances En Nutrición Acuícola VI*, 336–351. Retrieved from <http://www.aquaculture.stir.ac.uk/public/GISAP/pdfs/CienciaN.pdf>

Matarese, A. C., Kendall, A. W. J., Blood, D. M., & Vinter, B. M. (1989). *Laboratory guide to early life history stages of northeast Pacific fishes*. NOAA Technical Report Nmfs (Vol. 80).

McKenna, J. E., & Johnson, J. H. (2009). Spatial and temporal variation in distribution of larval lake whitefish in eastern Lake Ontario: Signs of recovery? *Journal of Great Lakes Research*, 35(1), 94–100. <http://doi.org/10.1016/j.jglr.2008.10.004>

Mendoza, R., & Aguilera, C. (2001). Bases fisiológicas del desarrollo de larvas de *Atractosteus spatula* y perspectivas para su cultivo. *Ciencia UANL*, 4(2), 161–168. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/962>

Meusnier, I., Singer, G. A. C., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D. N., & Hajibabaei, M. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9, 4–7. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-214>

Miller, R. R. (2009). *Peces dulceacuícolas de México*. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Sociedad Ictiológica Mexicana A. C., El colegio de la Frontera Sur y Consejo de los Peces del Desierto México-Estados Unidos.

Miller, R. R., Minckley, W. L., Norris, S. M., & Schmitter Soto, J. J. (2009). *Peces dulceacuícolas de México*. Retrieved from <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/paguadulceA.pdf> <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/paguadulceB.pdf> <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/paguadulceC.pdf> <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/PaguadulceD.pdf>

Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.

Nelson, J. S., Grande, T., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the world*.

Oliva-Rivera, J. J., Ocaña, F. A., De Jesús-Navarrete, A., De Jesús-Carrillo, R. M., Vargas-Espósitos, A. A., Oliva-Rivera, J. J., ... Vargas-Espósitos, A. A. (2016). Eventos reproductivos del caracol *Pomacea flagellata* (Mollusca: Ampullaridae) en la laguna de Bacalar, Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical*, 64(4), 1643–1650. <http://doi.org/10.15517/rbt.v64i4.22871>

- Ordóñez-López, U., Huchin-Sel, R., Peniche-Pérez, J., Gallegos-Fernández, S., Sosa-Pinto, R., & Vásquez-Yeomans, L. (2013). Variación temporal del ictioplancton colectado con trampas de luz en los puertos de chuburná y yucalpetén, yucatán, México. *Hidrobiológica*, 23(2), 265–273. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972013000200014&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972013000200014&script=sci_arttext&lng=pt)
- Park, J. M., Mun, S. J., Yim, H. S., & Han, K. H. (2017). Egg Development and Larvae and Juveniles Morphology of Carp , *Cyprinus carpio* in Korean. *Development & Reproduction*, 21(3), 287–295.
- Park, J., Yim, H., Lee, Y., Kim, H., & Han, K. (2015). Egg Development of the Ussurian Bullhead Fish , *Leiocassis ussuriensis* ( Pisces: Bagridae ) and Morphological Development of Its Larvae and Juveniles. *Development & Reproduction*, 19(4), 189–196.
- Pegg, G. G., Sinclair, B., Briskey, L., & Aspden, W. J. (2006). MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef , Australia. *Scientia Marina*, 70S2(October), 7–12. <http://doi.org/10.3989/scimar.2006.70s27>
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14, 1–14. <http://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BARCODING, BOLD : The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*, 7(April 2016), 355–364. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x>
- Richards, W. J. (2005). Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for the Western Central North Atlantic tãp 2. *CRC Press*.
- Rider, S. J., & Margraf, F. J. (1997). Dynamics of ichthyoplankton in the Kanawha river, west Virginia. *Journal of Freshwater Ecology*, 12(2), 239–251. <http://doi.org/10.1080/02705060.1997.9663532>
- Riemann, L., Alfredsson, H., Hansen, M. M., Als, T. D., Nielsen, T. G., Munk, P., ... Castonguay, M. (2010). Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters*, 6(6), 819–22. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0411>
- Rodríguez, J. M., Alemany, F., & García, A. (2017). *A guide to the eggs and larvae of 100 common Western Mediterranean Sea bony fish species*.
- Rodríguez, J. M., Gonzalez-Pola, C., Lopez-Urrutia, A., & Nogueira, E. (2011). Composition and daytime vertical distribution of the ichthyoplankton assemblage in the central Cantabrian Sea shelf, during summer: An Eulerian study. *Continental Shelf Research*, 31(14), 1462–1473. <http://doi.org/10.1016/j.csr.2011.06.007>

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Schmitter-Soto, J. J. (1996). Catalogo de los peces continentales de quintana roo, 227. Retrieved from <http://www.nativefishlab.net/library/textpdf/20569.pdf>
- Schmitter-Soto, J. J., & Gamboa-Pérez, H. C. (1996). Composición y distribución de peces continentales en el sur de Quintana Roo, Península de Yucatán, México. *Rev. Biol. Trop.*, 44(1), 199–212.
- Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., & Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. *Environmental Research*, 137, 246–255. <http://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.12.014>
- Teodósio, M. A., Paris, C. B., Wolanski, E., & Morais, P. (2016). Biophysical processes leading to the ingress of temperate fish larvae into estuarine nursery areas: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 183, 187–202. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.10.022>
- Valdez-moreno, M., Vásquez-Yeomans, L., Elias-Gutierrez, M., Ivanova, N. V., & Hebert, P. D. N. (2010). Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan, (January), 665–671. <http://doi.org/10.1071/MF09222>
- Vásquez-Yeomans, L., Ordoñez-López, U., & Sosa-Cordero, E. (1998). Fish larvae adjacent to a coral reef in the western Caribbean sea off Mahahual, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 62(1), 229–245. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1998/00000062/0000001/art00021>
- Victor, B. C. (2018). Retrieved August 18, 2018, from [www.Coralreeffish.com](http://www.Coralreeffish.com), versión (15/2018)
- Victor, B. C. (2009). Identification of the larval and juvenile stages of the Cubera Snapper (*Lutjanus cyanopterus*) using DNA barcoding. *Zootaxa*, 36(2215), 24–36.
- Victor, B. C., Valdez-Moreno, M., & Vásquez-Yeomans, L. (2015). Status of DNA Barcoding Coverage for the Tropical Western Atlantic Shorefishes and Reef Fishes. *DNA Barcodes*, 3(1), 85–93. <http://doi.org/10.1515/dna-2015-0011>
- Weber, M. J., Ruebush, B. C., Creque, S. M., Redman, R. A., Czesny, S. J., Wahl, D. H., & Dettmers, J. M. (2015). Early life history of alewife *Alosa pseudoharengus* in southwestern Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research*, 41(2), 436–447. <http://doi.org/10.1016/j.jglr.2015.03.009>
- Weiss, G. (1981). Ictioplancton del estuario de Lagoa dos Patos, Brasil. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/5041>