



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

---

POSGRADO EN BIOCENCIAS

ESTRUCTURA DEL GENOMA MITOCONDRIAL  
DEL BAGRE YAQUI (*Ictalurus pricei*) EN EL  
NOROESTE DE MEXICO.

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

CARLOS ALONSO BALLESTEROS CÓRDOVA

Hermosillo, Sonora, México

19 de Agosto de 2013

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**ESTRUCTURA DEL GENOMA MITOCONDRIAL DEL BAGRE YAQUI (*Ictalurus pricei*) EN EL NOROESTE DE MÉXICO**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN BIOCENCIAS**

**Presenta:**

**CARLOS ALONSO BALLESTEROS CÓRDOVA**

**Hermosillo, Sonora**

**19 de Agosto de 2013**

## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Estructura del Genoma Mitocondrial del bagre Yaqui (*Ictalurus pricei*) en el Noroeste de México”, presentada por Carlos Alonso Ballesteros Córdova, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Alejandro Varela Romero  
Director



Dr. José Manuel Grijalva Chon  
Sinodal Secretario



Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez  
Sinodal



Dr. Faustino Camarena Rosales  
Sinodal

## DEDICATORIA

*A toda mi familia, amigos, a mi novia y todas esas personas importantes que siempre me han apoyado e inspirando para seguir adelante.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico en el financiamiento de mi posgrado y el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad de Sonora y al Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por brindarme la formación académica para superarme, además de darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis.

A mi director de tesis, Dr. Alejandro Varela por su apoyo, consejos, dedicación, paciencia y amistad durante la realización de esta tesis.

A mi comité de tesis Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez, Dr. José Manuel Grijalva Chon y Dr. Faustino Camarena Rosales, por sus consejos, sugerencias, apoyo y dedicación en la elaboración de esta investigación.

A Dean A. Hendrickson, Jim E. Brooks, Dave Neally y Nick Smith quienes apoyaron en la recolecta de muestras y provisión de tejidos.

A las personas que se encontraron en el Laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS, a Melissa y los alumnos de Estancias de Investigación de la Licenciatura en Biología que me apoyaron de diferentes formas para realizar este trabajo.

A mi novia, Daniela, por su amor incondicional, además de su apoyo y motivación para seguir superándome cada vez más.

A mis padres que siempre me han dado todo y gracias a ellos no me ha faltado nada en ningún sentido, a mi hermana por su ayuda en el diseño de figuras, a mi hermano por su apoyo, a todos mis amigos y personas importantes que siempre me han motivado y apoyado para lograr mis metas.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Características del bagre Yaqui y problemática de la especie	4
2.2. Características y replicación del ADNmt	6
2.3. El ADNmt en estudios evolutivos de peces	9
2.4. La filogenia del género <i>Ictalurus</i>	14
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos particulares	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Obtención de muestras	18
5.2. Extracción y análisis del ADN	19
5.3. Uso y diseño de oligonucleótidos	20
5.4. Amplificación por PCR	21
5.5. Electroforesis de los productos de PCR	22
5.6. Secuenciación y análisis de los productos de PCR	22
5.7. Análisis filogenético	23
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1. Organización del genoma	25
6.2. Composición de bases	27

<b>6.3. Genes codificadores de proteína</b>	28
<b>6.4. Unidades ribosomales</b>	29
<b>6.5. Genes no codificadores de proteínas</b>	30
<b>6.6. ARNs de transferencia</b>	33
<b>6.7. Análisis filogenético</b>	37
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	43
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b>	45
<b>IX. LITERATURA CITADA</b>	47



## RESUMEN

El bagre Yaqui (*Ictalurus pricei*) es una especie de interés acuícola y amenazada de extinción por causas antropogénicas. La información disponible para la especie evidencia que su estudio y conservación también deben sustentarse en análisis integrales de sus relaciones filogenéticas. El presente trabajo determinó la secuencia nucleotídica completa y estructura del genoma mitocondrial de *I. pricei*, para proporcionar información sobre su origen y relaciones filogenéticas. El genoma mitocondrial completo se obtuvo de dos haplotipos geográficos de *I. pricei*, uno del Río Yaqui y otro del Río Fuerte en Chihuahua, a partir de la técnica “primer walking”. Cada genoma mostró una longitud de 16,503 pb con el mismo arreglo que la mayoría de vertebrados, compuesto por una región control, 13 genes codificadores para proteínas, 2 ARNr’s y 22 ARNt’s. Los contenidos de A+T de estos genomas fue similar entre ambos haplotipos y con la especie hermana, el bagre de canal, *I. punctatus*. Los codones de inicio y terminación resultaron conservados en el género *Ictalurus*. La estructura secundaria de los ARNt’s se determinó en ambos haplotipos de *I. pricei* evidenciando diferencias en dos de ellos. Quince de estos ARNt’s fueron conservados respecto a los de *I. punctatus*. Como estructura de la región control se detectaron las secuencias encargadas de la replicación y transcripción de este genoma, además de la secuencia putativa del origen de replicación de la cadena ligera en la región WANCY flanqueada por *ND2* y *COI*. El análisis filogenético realizado bajo los criterios de distancias genéticas, máxima parsimonia y máxima verosimilitud mostraron topologías y soporte de nodos consistentes para nuestro grupo de interés colocando a los haplotipos de *I. pricei* en un clado con *I. punctatus* reafirmando la monofilia del género y de la familia Ictaluridae. Este clado se agrupó con el bagre armado de China *Cranoglanis boudierius* de la familia Cranoglanididae. Adicionalmente se detectó la cercanía del clado Ictaluridae + Cranoglanididae con la familia Pangasidae al interior de los Siluriformes.

## ABSTRACT

The Yaqui catfish (*Ictalurus pricei*) is a species of aquaculture interest and threatened of extinction by anthropogenic causes. The information available for the species shows that the study and conservation should be based on comprehensive analysis of their phylogenetic relationships. Our study pretends to know the complete nucleotide sequence and structure of the mitochondrial genome of *I. pricei*, to provide information about its origin and phylogenetic relationships. We obtained the complete mitochondrial genome of two geographic haplotypes of *I. pricei*, one from the Yaqui River and another from Fuerte River in Chihuahua, by the "primer walking technique ". Each genome was 16,503 bp in length, and with the same arrangement than most of the vertebrates, comprising the control region, 13 protein encoding genes, 2 rRNA's and 22 tRNA's. The A+T content of these genomes were similar between both haplotypes and with the sister species, channel catfish *I. punctatus*. The start and stop codons were conserved into the genus *Ictalurus*. tRNA's secondary structure was determined for both haplotypes of *I. pricei* showing differences in only two of them. Fifteen of these tRNA's were conserved compared to those of *I. punctatus*. In the control region structure, we observed the sequences for the replication and transcription of the genome, in addition we found the putative sequence of the replication origin of the light strain in the WANCY region flanked by *ND2* and *COI*. The phylogenetic analysis performed under genetic distances, maximum parsimony and maximum likelihood criteria, showed consistent topologies and node support for our interest group, clading *I. pricei* haplotypes in a single clade with *I. punctatus* supporting the monophyly of the genus and the family Ictaluridae. This clade was grouped with the helmet catfish *Cranoglanis boudierius* from the Cranoglanididae family. Additionally, we were able to detect the proximity of the clade Ictaluridae + Cranoglanididae with the Pangasidae family into the Siluriformes.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Mapa del genoma mitocondrial de vertebrados. Modificado de Waldbieser <i>et al.</i> (2003). OH = Origen de replicación de la cadena pesada, OL = Origen de replicación de la cadena ligera, CO = Citocromo Oxidasa, ND = Subunidades de la NADH deshidrogenada, ATP = Subunidades de la ATP sintasa, CYTB = Citocromo b. Genes ribosomales 12S y 16S. Genes de los ARN de transferencia, indicados por su abreviación de tres letras.	8
2	Relaciones filogenéticas basadas en caracteres morfológicos de los bagres del género <i>Ictalurus</i> , modificado de Lundberg (1992).	15
3	Localización geográfica de las localidades de recolecta del bagre Yaqui <i>Ictalurus pricei</i> utilizados en este estudio.	19
4	Alineamiento de la región control de <i>I. pricei</i> de los ríos Yaqui y Fuerte con tres Siluriformes mostrando las secuencias conservadas.	34
5	Estructuras secundarias conservadas entre los 2 haplotipos geográficos de <i>I. pricei</i> e <i>I. punctatus</i> .	36
6	Estructura secundaria de los ARNt del bagre Yaqui <i>I. pricei</i> del Río Yaqui comparada con la de <i>I. punctatus</i> . Los círculos blancos representan las diferencias en composición de bases con <i>I. punctatus</i> y los círculos negros representan la diferencia entre <i>I. pricei</i> del Río Fuerte.	36
7	Árbol de Neighbor Joining para distancias genéticas bajo el criterio de Kimura 2 parámetros para las especies analizadas. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap obtenidos.	40
8	Árbol filogenético obtenido bajo el criterio de máxima parsimonia (MP) para 25 genomas mitocondriales completos con <i>O. mykiss</i> como grupo externo. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap obtenidos.	41
9	Árbol filogenético obtenido bajo el criterio de máxima verosimilitud (ML) para 25 genomas mitocondriales completos con <i>O. mykiss</i> como grupo externo. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap obtenidos.	42

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Lista de localidades de recolecta de los bagres nativos utilizados en este estudio. Las localidades fueron tomadas de Varela-Romero (2007). USFWS = United States Fish and Wildlife Service, AZGFD = Arizona Game and Fish Department, mnsn = metros sobre el nivel del mar.	18
2	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación del genoma mitocondrial del bagre Yaqui.	20
3	Especies utilizadas para el análisis filogenético.	24
4	Organización del genoma mitocondrial de <i>I. pricei</i> .	26
5	Contenido de porcentaje de A+T en el genoma mitocondrial completo de <i>I. pricei</i> basado en el análisis de dos haplotipos geográficos. Las abreviaciones de los genes fueron tomadas de la tabla 4.	27
6	Longitud y codones de inicio y terminación en los genes que codifican para proteínas del genoma mitocondrial completo de <i>I. pricei</i> basado en el análisis de dos haplotipos geográficos. Los valores y codones en negritas representan diferencias entre los haplotipos de <i>I. pricei</i> e <i>I. punctatus</i> con el resto de los Siluriformes analizados. Las abreviaciones de los genes fueron tomadas de la tabla 4.	28
7	Comparación entre las unidades <i>12sARNr</i> y <i>16sARNr</i> del genoma mitocondrial completo de <i>I. pricei</i> basado en el análisis de dos haplotipos geográficos.	30

## I. INTRODUCCIÓN

Los bagres pertenecen al orden Siluriformes que consta de 34 familias, alrededor de 402 géneros y más de 2,400 especies (Nelson, 1994), posicionándolo como uno de los grupos de vertebrados más grandes en nuestro planeta. El estudio de las especies de bagres ha resultado de gran importancia debido a su diversidad. En México existen en forma natural tres familias de bagres, entre ellas la familia Ictaluridae, considerada como un grupo de bagres dulceacuícolas endémicos a Norteamérica y América Central (Burgess, 1989). Esta familia comprende siete géneros, donde *Ictalurus* está representado por ocho especies (Mayden *et al.* 1992). Este género es el único nativo registrado para el norte y centro de México (Rutter, 1896; Lundberg, 1992) y posee un gran potencial económico ya que engloba especies de importancia comercial, pesquera y acuícola como el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Jolly *et al.* 2001). Las ocho especies descritas de *Ictalurus* se encuentran en diversas vertientes de las cadenas montañosas de nuestro país. Recientemente, México ha sido mencionado como el centro de especiación del género *Ictalurus* (Miller *et al.* 2005). Lundberg (1992) propone a partir de rasgos morfológicos dos grupos principales para las especies del género *Ictalurus*, el clado *punctatus* y el clado *furcatus*.

Diversos factores naturales y antropogénicos han provocado la desaparición de poblaciones de peces en los últimos años, como es el caso del bagre Yaqui (*Ictalurus pricei*), especie nativa distribuida desde la Cuenca del Río Yaqui en Sonora y Chihuahua, hasta el Río Fuerte en Sinaloa, incluyendo varias localidades en el Río Mayo (Lundberg, 1992; Miller *et al.* 2005). La distribución y abundancia del bagre Yaqui se ha visto reducida en algunas localidades de los cauces de los ríos Yaqui y Mayo, especialmente en las áreas de baja a mediana elevación en Sonora, restringiendo esta especie a las cabeceras más remotas de las cuencas, amenazando su permanencia en sus hábitats naturales (Varela-Romero, 2007).

En la acuicultura, el uso de bagres exóticos congéneres que tienen un valor económico, como el bagre de canal (*I. punctatus*) y el bagre azul (*I. furcatus*), provenientes de los Estados Unidos de Norteamérica e introducidos en los habitats naturales del bagre Yaqui, se consideran una amenaza que afecta la conservación y aprovechamiento de ésta especie. La detección de híbridos entre los bagres Yaqui y de canal en recolectas de la región serrana de Sonora y Chihuahua es una evidencia de introgresión genética en ambientes naturales (Campoy-Favela *et al.* 1989; Miller *et al.* 2005).

En la actualidad, el uso de la acuicultura como una herramienta para la conservación y el manejo de las especies acuáticas en algún riesgo de extinción es una realidad gracias a la mejora en las técnicas de cultivo. Estas técnicas nos permiten conservar la fauna que participa en el equilibrio ecológico y que además tienen un interés científico y comercial. A pesar de su contribución positiva a la sociedad y a la economía, el desarrollo acuícola en nuestro país sigue sin alcanzar su pleno potencial para incrementar la producción en forma sostenible. México posee un gran potencial para el bienestar de su seguridad alimentaria mediante la generación de alimento para autoconsumo, sin embargo estos recursos naturales no han sido aprovechados de manera adecuada para cumplir con esa finalidad (FAO, 2006).

Para el manejo de recursos con importancia pesquera y acuícola como es el caso del bagre, el reconocimiento de la variabilidad genética puede ser de gran ayuda para su comercialización y repoblamiento (Ferguson, 1994), al igual que en el campo de la genética, ya que constituye la base en la que actúan los agentes que producen los cambios en la estructura genética de la población (Alvarez-Jurado, 1987). Si se considera que esta variación refleja la historia evolutiva de una especie y representa su probabilidad de adaptación para su conservación y aprovechamiento, el mantener la variabilidad genética permite una adaptación a los cambios en las condiciones ambientales ya sean naturales o en cautiverio (Beardmore *et al.* 1997). Esto resulta indispensable en la implementación de estrategias de conservación y manejo sobre todo en aquellas especies que presentan algún potencial acuícola.

Los estudios de genomas mitocondriales (ADNmt) han sido realizados en diversos organismos con el fin de determinar su identidad específica (taxonomía), variabilidad genética, hibridación y relaciones filogenéticas, esto se debe a diversas propiedades que esta molécula posee (Kumazawa *et al.* 1998; Lin *et al.* 2002; Wang *et al.* 2007; He *et al.* 2009; Saitoh *et al.* 2003). El ADNmt no es recombinante y posee diferentes niveles de conservación en sus genes, evoluciona más rápido que los genes nucleares y puede acumular información genética en cortos periodos de tiempo evolutivo (Avise, 1994; Randi, 2000; Rokas *et al.* 2003; Waldbieser *et al.* 2003; Hardman, 2005; Sullivan *et al.* 2006).

La información disponible sobre los genes mitocondriales, su estructura y relaciones filogenéticas del bagre Yaqui con las especies al interior de su género es muy escasa (Lundberg, 1992; Varela-Romero, 2007). Hasta la fecha, el único estudio publicado sobre secuenciación completa del genoma mitocondrial en el género *Ictalurus* se realizó para el bagre de canal *I. punctatus* (Waldbieser *et al.* 2003). Por lo tanto, el presente trabajo propone realizar estudios para el conocimiento de la genómica mitocondrial del bagre Yaqui. Las amenazas registradas (Varela-Romero *et al.* 2011) y las potenciales por el uso de bagres congéneres exóticos (*I. punctatus*) como sujeto de cultivo y siembras en la acuicultura extensiva en aguas continentales mexicanas acelera la necesidad de conocer la genómica de estos recursos ícticos. El conocimiento de la estructura de genomas mitocondriales de especies nativas es información básica para entender la evolución, origen y distribución de las especies de bagres nativos mexicanos, además representa una contribución a la genómica de especies de interés para la conservación y para el desarrollo económico nacional.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Características del bagre Yaqui y problemática de la especie

*Ictalurus pricei* se ha registrado históricamente habitando las cuencas de los ríos Yaqui, Sonora, Mayo, Fuerte y Casas Grandes en los estados de Sonora, Chihuahua, Sinaloa y el sur de Arizona (Lundberg, 1992; Miller *et al.* 2005; Varela-Romero y Hendrickson, 2009). Ocupa corrientes moderadas en sustrato lodoso, arenoso y rocoso. Los adultos se encuentran en aguas profundas durante el día, desplazándose hacia las corrientes y aguas quietas durante la noche con el fin de conseguir alimento (Burgess, 1989).

La similitud morfológica del bagre Yaqui con el bagre de canal sugiere una semejanza en su ecología y conducta (Minckley, 1973). Los caracteres morfológicos más utilizados para separar al bagre Yaqui de sus congéneres y especialmente del bagre de canal son el número de radios en la aleta anal, el número de radios en la aleta pectoral, el escaso grado de unión entre los huesos supraoccipital y supraneural, la longitud del hueso cleitra (menor en bagre Yaqui), la longitud de la base de la aleta anal (menor en el bagre Yaqui) y el número de branquiespinas (Minckley, 1973).

La presencia del bagre Yaqui en hábitats naturales está siendo impactada por la construcción de presas (Bojorquez *et al.* 1985) que promueven además del impacto por la modificación de los hábitats acuáticos naturales (Varela-Romero y Hendrickson, 2009), la competencia e hibridación con la especie no nativa *I. punctatus*, (Miller *et al.* 2005). Cabe mencionar que, inventarios de la especie en las cuencas de los ríos Sonora y Casas Grandes no han presentado registros en los últimos 60 años, por lo que se considera extirpada de esas localidades (Varela-Romero, 1995, 2007; Varela-Romero *et al.* 2011).



El bagre Yaqui se considera una especie de interés para la conservación y desde años atrás ha sido clasificada oficialmente bajo las categorías de “en peligro de extinción” (USFWS, 1984), “preocupación especial” (“Special concern”, Deacon *et al.* 1979; Williams *et al.* 1989; AGFD, 1992), “en peligro” (NatureServe, 2013) en los Estados Unidos de América y “sujeta a protección especial” por el gobierno Mexicano (SEMARNAT, 2002). Actualmente se considera como especie amenazada bajo la NOM 059-2010 (SEMARNAT, 2010).

Varela-Romero *et al.* (2011) reportan el esfuerzo de recolecta en 38 localidades de distribución natural del bagre Yaqui en la Sierra Madre Occidental, iniciadas a partir del año 2004 y considerando los registros históricos disponibles en la literatura (Miller, 1959, 1986; Hendrickson, 1984; Minckley *et al.* 1986; Smith y Miller, 1986; Hendrickson y Varela-Romero, 2002; Miller *et al.* 2005). A pesar de que se registraron más de 2,000 ejemplares de 27 especies de peces nativos y exóticos, sólo fue posible capturar 22 ejemplares del bagre Yaqui en su distribución natural, ocupando las cuencas de los ríos Yaqui y Fuerte (Varela-Romero *et al.* 2011). Las evaluaciones de campo realizadas por estos autores hasta el momento no registran la presencia del bagre Yaqui en localidades históricas de recolecta en las cuencas de los ríos Yaqui y Mayo y de ésta última, no se registró la especie considerando necesario un esfuerzo adicional antes de reconocer su desaparición en ésta cuenca (Varela-Romero *et al.* 2011).

Minckley y Marsh (2009) reportan la captura y transporte de ejemplares de bagre Yaqui de los ríos Aros y Sirupa de la Cuenca del Río Yaqui en los años 1987 y 1990, con el propósito de iniciar un programa de recuperación de la especie en territorio del Refugio de Vida Silvestre de San Bernardino en la zona fronteriza de la Cuenca del Yaqui en Arizona (SBNWR, por sus siglas en inglés). La progenie obtenida años después fue introducida en repesos del SBNWR y en tributarios del Valle Sulphur Springs donde sobreviven actualmente.

Los esfuerzos de conservación del bagre Yaqui de la vertiente Pacífico de la Sierra Madre Occidental en México han sido limitados debido a que la información de su

distribución y taxonomía es escasa. Lo anterior refleja la necesidad de implementar esfuerzos de estudio y conservación del bagre Yaqui. La filogenia molecular a partir del ADNmt es una herramienta que puede sustentar parte de los estudios requeridos para contribuir al conocimiento del origen, distribución y evolución de las especies nativas de bagres en el Noroeste de México.

## **2.2. Características y replicación del ADNmt**

El ADNmt se caracteriza por ser una molécula circular de doble hélice, haploide, transferida por herencia materna, la totalidad de éste genoma se transcribe como una unidad, no está sujeto a recombinación homóloga, se considera selectivamente neutral, se produce en múltiples copias en cada célula, su reproducción es continua y además de lo anterior, ésta molécula carece de intrones (Billington, 2003).

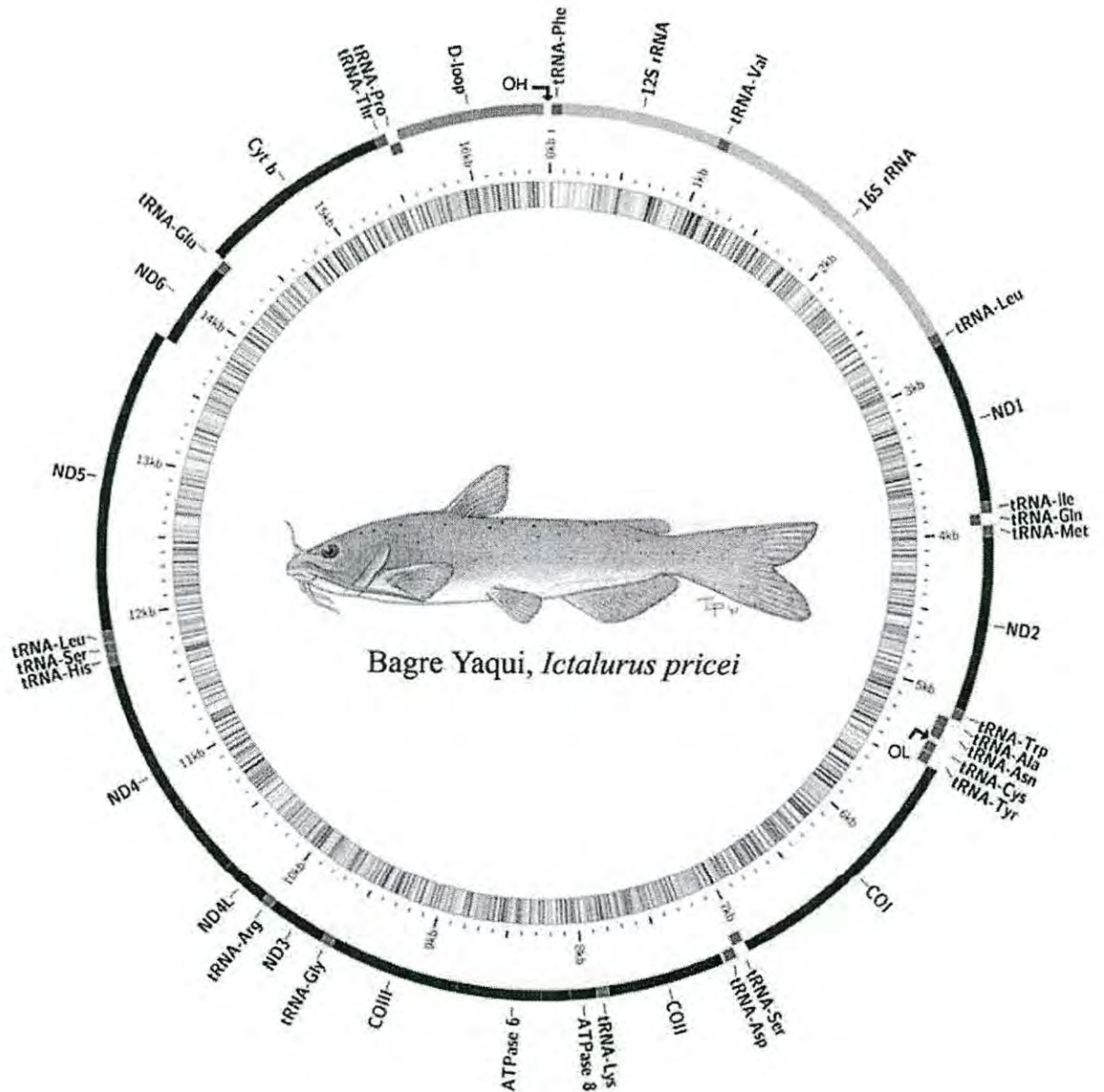
El ADNmt es muy utilizado para análisis de la variabilidad genética y estudios de evolución y filogenia ya que posee un alto poder resolutivo con diferentes niveles de conservación en sus genes (Rand, 2001). Se encuentra físicamente separado del ADN nuclear y es mucho más corto en longitud que este (Elías-Gutierrez y Valdez-Moreno, 2008) y es relativamente fácil de aislar, cualquier tejido puede ser utilizado para la extracción de ésta molécula. Evoluciona más rápido (de 5 a 10 veces) que los genes nucleares y acumula variabilidad genética dentro y entre poblaciones en cortos periodos de tiempo evolutivo (Avice, 1994). Esto último se asocia al escape eventual de radicales libres asociados al daño oxidativo causado en el transporte de electrones durante la respiración celular (Bielawski y Gold, . 2002; Reyes *et al.* 1998). Además el ADNmt se caracteriza por la ausencia de histonas y mecanismos de reparación.

En lo que respecta a la estructura del ADNmt en vertebrados, su tamaño puede variar de los 16 a 18 kb (Shadel y Clayton, 1993). Posee 13 genes de expresión polipeptídica de la cadena respiratoria, dos unidades ribosomales (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) (Shadel y Clayton, 1993; Waldbieser *et al.* 2003; Wang *et al.* 2007), una región control y dos orígenes de replicación, uno para la cadena pesada (H-strand) y

otro para la cadena ligera (L-strand) (Shadel y Clayton, 1993, Figura 1). La cadena pesada alberga la mayor parte de las secuencias que codifican para 12 polipéptidos, 14 ARNt's y dos ARNr's, mientras que la cadena ligera sólo codifica para un polipéptido (*ND6*) y ocho ARNt's. Estas cadenas se diferencian una de otra en función de su contenido en guanina y timina (Shadel y Clayton, 1997).

Se ha determinado que la estructura del genoma mitocondrial en vertebrados es conservada, con un patrón típico entre sus especies (Boore, 1999). A pesar de esto, la organización de los elementos reguladores y las secuencias nucleotídicas implicadas en la transcripción y replicación del ADNmt presentan una considerable variación (Shadel y Clayton, 1997).

Hoy en día se sabe que la variación genética diferencial entre los genes mitocondriales es una característica natural en este genoma. Tanaka y Ozawa (1994) postularon que la variación del ADNmt es ocasionada por la replicación asimétrica de esta molécula, siendo promovida por sus dos orígenes de replicación, influenciando en el proceso mutacional de las secuencias de ADN. El primer origen de replicación inicia en la región control (*RC*) en dirección al gen citocromo *b* (*CYTB*) y comienza a desplazarse a lo largo del genoma circular. Cuando la horquilla de replicación alcanza el segundo origen de replicación representado por una estructura en forma de tallo localizada en un fragmento conocido como región WANCY (por la nomenclatura de los aminoácidos Triptófano, Alanina, Asparagina, Cisteína y Treonina) después del gen citocromo *c* oxidasa I (*COI*) y flanqueada por este y el gen *ND2* (Taanman, 1999), la replicación de la segunda cadena complementaria se inicia en dirección opuesta de regreso hacia el gen *COI*. Hasta el momento de que la horquilla de replicación de la primera cadena ha pasado por el segundo origen de replicación, la primera cadena sintetizada permanece aún en forma de cadena sencilla por el tiempo que tarde la horquilla de replicación de la segunda en convertirla en una molécula bicatenaria (Faith y Pollock, 2003).



**Figura 1.-** Mapa del genoma mitocondrial de vertebrados. Modificado de Waldbieser *et al.* (2003). OH = Origen de replicación de la cadena pesada, OL = Origen de replicación de la cadena ligera, CO = Citocromo Oxidasa, ND = Subunidades de la NADH deshidrogenada, ATP = Subunidades de la ATP sintasa, CYTB = Citocromo b. Genes ribosomales 12S y 16S. Genes de los ARN de transferencia, indicados por su abreviación de tres letras.

Durante el proceso de replicación, algunas secciones del genoma mitocondrial permanecen diferentes periodos de tiempo en estado de cadena sencilla, expuesta al ambiente oxidativo, causado por el transporte de electrones en la mitocondria debido a la fosforilación oxidativa, promoviendo la alta tasa mutacional característica de esta molécula, resultando una mayor variabilidad genética (Tanaka y Ozawa, 1994). Debido a que el arreglo de los genes y su variación es característico de cada especie, los estudios evolutivos de filogenia a partir del ADNmt tienen un alto poder resolutivo (Avice, 1994), puede proporcionar información para su uso en estudios de identidad específica, filogenia, programas de conservación y repoblamiento de especies nativas en algún riesgo de extinción.

### 2.3. El ADNmt en estudios evolutivos de peces

El uso de genes mitocondriales ha sido reportado anteriormente para la detección de inferencias filogenéticas en bagres de Norteamérica (Hardman, 2002; Wilcox *et al.* 2004; Sullivan *et al.* 2006). Los marcadores moleculares más utilizados han sido genes conservados como las unidades ribosomales *12sARNr* y *16sARNr*, genes codificadores de proteínas como *CYTB* e inclusive los genes nucleares *rag1* y *rag2* han sido recientemente utilizados para buscar una inferencia complementaria a la mitocondrial habitualmente utilizada (Hardman, 2002; Hardman, 2004; Hardman y Page 2003; Wilcox *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2006). El gen *CYTB* es el más estudiado en peces, su utilidad aparentemente recae en la variación genética promovida por el modelo de replicación asimétrica del genoma mitocondrial (Kocher *et al.* 1989). Con este gen es posible describir las relaciones filogenéticas de casi la totalidad del grupo de peces óseos a nivel género y familia (Lydeard y Roe, 1997). Sin embargo, las subunidades de *ATP* sintasa 6 y 8 han demostrado ser igual de efectivos en términos de resolución como el *CYTB* en varios taxa, además de ser un marcador fácilmente aplicable en estudios filogenéticos (Demandt, 2012).

Las unidades ribosomales *12sARNr* y *16sARNr* son utilizadas más frecuentemente en estudios de taxa más alejados. Las sustituciones de pares de bases en la subunidad *12sARNr* son acumuladas de manera relativamente lenta, aproximándose al promedio de

todo el genoma mitocondrial, mientras que en la subunidad *16sARNr* las sustituciones evolucionan de manera incluso más lenta (Simon *et al.* 1994). Stepien *et al.* (1993) utilizan la subunidad *12sARNr* para examinar las relaciones entre especies, género, tribus, familias y subordenes de peces Blenniformes y encuentran una gran utilidad en estos niveles, además de mostrar congruencia con las hipótesis morfológicas. Parker y Kornfield (1995), Orti *et al.* (1996) y Stepien *et al.* (1997) al evaluar las diferencias en la cantidad de señal filogenética entre regiones de tallo y bucle de genes ribosomales reportaron una mayor señal filogenética en niveles taxonómicos más altos (familia), en las regiones de tallo de evolución más lenta. Esto brinda caracteres más útiles para el análisis en niveles taxonómicos inferiores en las regiones de bucle con cambios más rápidos.

La región control (*RC*) del ADNmt es la encargada de la replicación y transcripción de éste genoma. En peces la *RC* generalmente posee un tamaño grande que va de los 888 a 1223 pb (Faber y Stepien, 1998). Adicionalmente, la *RC* posee segmentos en tándem repetidos y un conjunto de bloques de secuencias conservadas involucradas en la replicación y transcripción del ADNmt, lo que ha resultado bastante útil en algunos estudios de sistemática molecular (Faber y Stepien, 1998). Debido a estas características, la *RC* es una secuencia muy utilizada en estudios de estructura poblacional y en la obtención de relaciones entre especies muy cercanas de peces (Arnason y Rand, 1992; Sturmbauer y Meyer, 1992; Brown *et al.* 1993; Lee *et al.* 1995).

El gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa I (*COI*) también ha sido recientemente utilizado en la determinación de relaciones filogenéticas entre Siluriformes (Cramer *et al.* 2007). Según Hebert *et al.* (2003) este gen posee un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial con una tasa de evolución molecular aproximadamente tres veces mayor que las unidades *12sARNr* o *16sARNr*. El gen *COI* ha sido propuesto como un sistema de bioidentificación global en animales (Hebert *et al.* 2003). Debido a que el ADNmt posee una tasa de mutación relativamente rápida, existe una variación bastante alta en las secuencias de este gen entre las especies, pero baja variabilidad interespecífica. El código de barras del ADN localizado en el gen *COI* es una técnica molecular propuesta por Hebert *et al.* (2003) para una identificación precisa, rápida y sencilla de especies (Costa y

Carvalho, 2007). Esta técnica logra facilitar el descubrimiento de nuevas especies (Ward *et al.* 2008a) y la identificación de especies bandera en investigaciones taxonómicas (Ward *et al.* 2008b; Lara *et al.* 2010). Otros trabajos documentan el uso del código de barras del ADN en casos de errores en identificación de especies (Rock *et al.* 2008; Ward *et al.* 2008b) e incluso para resolver problemas de hibridación (Hubert *et al.* 2008; Rock *et al.* 2008).

A pesar de que los resultados filogenéticos a partir de un sólo gen como *CYTB*, *16sARNr* o *COI* (Kartavtsev y Lee, 2006; Kartavtsev *et al.* 2007) han mostrado ser satisfactorios en análisis a nivel especie o familia, respectivamente, este enfoque puede proporcionar datos filogenéticos inadecuados al ser aplicado en taxa superiores, debido a la capacidad de información insuficiente y efectos de homoplasia. De tal manera que es necesario realizar comparaciones con genomas completos para determinar las inferencias filogenéticas entre taxa superiores (Saitoh *et al.* 2003). Los recientes avances en técnicas moleculares han permitido facilitar la obtención de genomas mitocondriales completos en varias especies de peces, creando oportunidades sin precedentes para la reconstrucción de filogenias (Jondeung *et al.* 2007; Kartavtsev *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007).

La disminución en los costos de las técnicas de secuenciación ha brindado la posibilidad de utilizar genomas completos como materia prima en la búsqueda de inferencias filogenéticas, ofreciendo análisis a diferentes niveles genómicos, como su estructura primaria y el orden de los genes (Philippe *et al.* 2005). Recientemente, varios autores han argumentado que tanto el muestreo extensivo de los taxa, como el aumento de secuencias de genes para el estudio del grupo de interés, reducen el error filogenético (Zwickl y Hillis, 2002). La inferencia de las relaciones filogenéticas de metazoarios a partir de las secuencias de los genomas mitocondriales completos ha resultado muy popular en los últimos años (Boore *et al.* 2005). Es por esto que el área de la filogenómica ha abierto un nuevo espacio para el logro de este objetivo en varios grupos de vertebrados como los anfibios (Peng *et al.* 2003), reptiles (Kumazawa *et al.* 1998), las aves (He *et al.* 2009), mamíferos (Lin *et al.* 2002) y para los peces (Saitoh *et al.* 2003; Wang *et al.* 2007; Prosdocimi *et al.* 2011; Nakatani *et al.* 2011). Actualmente, se cuenta con la secuencia

completa del genoma mitocondrial de algunos Siluriformes como el bagre gigante del Mekong, *Pangasianodon gigas* (Jondeung *et al.* 2007), el bagre toro, *Liobagrus obesus* (Kartavtsev *et al.* 2007), el bagre chino trompudo, *Leiocassis longirostris* (Wang *et al.* 2011) y el bagre armado, *Cranoglanis boudierius* (Peng *et al.* 2006), reconocido como el bagre hermano asiático más cercano a la familia Ictaluridae (Sullivan *et al.* 2006). Para el caso de la familia Ictaluridae y más aún del género *Ictalurus*, sólo se cuenta con el genoma mitocondrial completo del bagre de canal *I. punctatus*, que se realizó debido a que la especie es de gran utilidad en los ámbitos comercial y científico (Waldbieser *et al.* 2003).

La secuencia de *I. punctatus* por Waldbieser *et al.* (2003) se determinó a partir de la transposición de secuencias de fragmentos de PCR clonado, la secuenciación directa de fragmentos de PCR de regiones seleccionadas y el montaje de las secuencias de datos en un solo “contig” de 16,497 pb. El análisis de la secuencia reveló una región control, 13 genes que codifican para proteínas, 2 ARNr's y 22 ARNt's. La estructura del genoma mitocondrial del bagre de canal resultó ser típica a la de los vertebrados con un orden idéntico de genes (Boore, 1999) y una poliadenilación en el transcrito para formar codones de terminación en los genes *ATP8*, *ATP6*, *ND4L* y *ND5*. Las comparaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes *CYTB* y *COI* demostraron la separación genética de los géneros *Ictalurus*, *Pylodictis* y *Ameiurus* (Waldbieser *et al.* 2003), lo que resulta coherente con la clasificación taxonómica dentro de la familia Ictaluridae (Hardman y Page, 2003; Varela-Romero, 2007). Waldbieser *et al.* (2003) mencionan que el análisis del genoma mitocondrial completo fue útil en la confirmación de las relaciones taxonómicas al interior de Siluriformes, estimando las distancias genéticas entre el bagre de canal y otros teleósteos cultivados.

Los estudios en filogenómica también han resultado útiles en esclarecer las relaciones filogenéticas de especies críticamente amenazadas como es el caso del bagre gigante de Mekong *Pangasianodon gigas* (Jondeung *et al.* 2007). El análisis filogenético para esta especie se basó en las secuencias aminoacídicas de los genes codificadores de proteínas mitocondriales y de las secuencias nucleotídicas de las unidades *12sARNr* y *16sARNr*. Los análisis filogenéticos (mínima evolución, máxima parsimonia, máxima



verosimilitud e inferencia bayesiana) del conjunto de datos de proteínas fueron congruentes con una fractura basal en los órdenes Loricarioidei y Siluroidei, apoyando una relación más estrecha del bagre gigante de Mekong de la familia Pangasiidae con la familia Siluridae que con Bagridae. El genoma mitocondrial completo del bagre gigante de Mekong resultó ser de 16,533 pb (mayor que en el bagre de canal) y al igual que en otros peces y vertebrados (Boore, 1999), esta molécula corresponde con la estructura del genoma mitocondrial con una región control, 13 genes codificadores de proteína, dos ARNr's y 22 ARNt's.

El genoma mitocondrial completo del bagre cabeza toro *Liobagrus obesus* fue obtenido con la finalidad de determinar monofilia en diferentes familias del orden Siluriformes basándose en el gen *CYTB* y la unidad *16sARNr* (Kartavtsev, 2007). El genoma mitocondrial de *L. obesus* fue aislado a partir de la técnica de Long-PCR (reacción de amplificación de miles de pares de bases, más extenso que una PCR convencional) utilizando oligonucleótidos universales a partir de la técnica "primer walking" mediante secuencias flanqueantes. Este genoma mostró una longitud de 16,531 pb con la estructura típica para vertebrados. Los datos inferidos en el estudio a partir del gen *CYTB* apoyaron la hipótesis de que la especiación en el orden de los Siluriformes, en la mayoría de los casos sigue un patrón geográfico, a través de la acumulación de numerosos cambios genéticos durante un largo periodo de tiempo.

El genoma mitocondrial de otro bagre amenazado, el bagre armado *Cranoglanis boudierius* (Peng *et al.* 2006), único miembro de la familia Cranoglanididae se obtuvo a partir de la técnica LA PCR (Long and accurate PCR) mostrando una secuencia de 16,539 pb con una región control, 13 genes codificadores de proteínas, dos ARNr's y 22 de ARNt's. El análisis filogenético de *C. boudierius* se desarrolló esperando aclarar las relaciones filogenéticas de bagres a un nivel más alto. *C. boudierius* mostró una estrecha relación con el bagre gigante de Mekong *P. gigas*, una hipótesis diferente de la propuesta en trabajos recientes (Diogo, 2005; Hardman, 2005; Peng *et al.* 2005) donde Cranoglanididae aparece como el grupo hermanos de Ictaluridae.

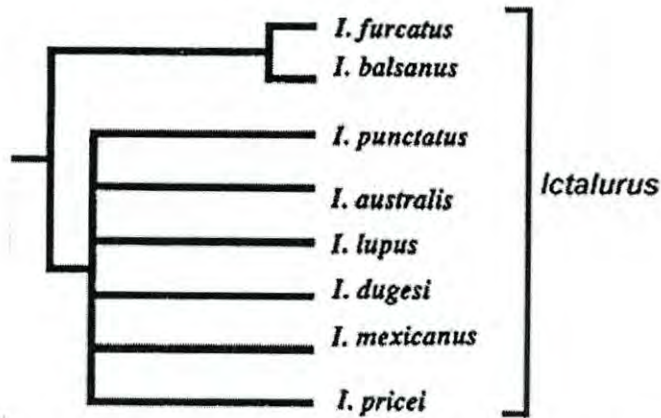
Es evidente que las investigaciones en genómica mitocondrial de especies de bagre han ido en aumento en los últimos años y resultan útiles en esclarecer sus relaciones evolutivas, biogeográficas y filogenéticas, siendo de gran ayuda para determinar estrategias de mejor uso, aprovechamiento y conservación para las especies de interés científico, comercial y ecológico.

#### **2.4. La filogenia del género *Ictalurus***

Los estudios filogenéticos de la familia Ictaluridae a partir de datos morfológicos (Lundberg, 1992) y paleontológicos (Lundberg, 1970) han permitido identificar cerca de 60 especies vivientes, al menos 4 extintas y todas provenientes de un ancestro común monofilético. Además, se han encontrado sinapomorfias (posesión en común de un carácter) compartidas entre los géneros *Astephus* e *Ictalurus*, considerándolo como un taxón plesiomórfico (caracteres ancestrales similares). La información evolutiva de la familia Ictaluridae demuestra una mayor complejidad que las relaciones obtenidas a partir de datos anatómicos (Lundberg, 1992; Hardman, 2002; Hardman y Page, 2003; Hardman, 2004; Wilcox *et al.* 2004; Sullivan *et al.* 2006; Varela-Romero, 2007). El estudio de Lundberg (1992) sobre relaciones filogenéticas del género *Ictalurus* generó un árbol filogenético construido a partir de características merísticas y morfométricas, definiendo dos grupos principales, el clado *punctatus* con las especies *I. punctatus*, *I. australis*, *I. lupus*, *I. dugesii*, *I. mexicanus* e *I. pricei* y el clado *furcatus* con las especies *I. furcatus* e *I. balsanus* (Figura 2).

Los estudios para conocer las relaciones filogenéticas entre los bagres ictalúridos han sido realizados a partir de datos morfológicos (Lundberg, 1992; Mo, 1991; Rodiles-Hernández *et al.* 2005) o moleculares (Hardman, 2002; Hardman, 2003; Wilcox *et al.* 2004; Varela-Romero, 2007). Los estudios filogenéticos a niveles superiores se han respaldado sólo en pocas familias, pero con una mayor cobertura en el muestreo de los taxa en sí, (Sullivan *et al.* 2006). A pesar del progreso en el conocimiento de la filogenia de los bagres, sus relaciones a nivel de familias, géneros y de muchas de las especies no es suficientemente claro (Sullivan *et al.* 2006). Algunas de las hipótesis basadas en datos

morfológicos o moleculares no concuerdan y requieren ser replanteados incorporando caracteres adicionales y un mayor número de especies para los análisis.



**Figura 2.-** Relaciones filogenéticas basadas en caracteres morfológicos de los bagres del género *Ictalurus*, modificado de Lundberg (1992).

La escasa información del género *Ictalurus*, sobre todo de especies mexicanas, requiere un incremento en sus estudios. Varela-Romero (2007) analizó secuencias de los genes mitocondriales *12sARNr* y *CYTB*, buscando esclarecer las relaciones filogenéticas de 40 individuos de bagres nativos a la vertiente Pacífico de la Sierra Madre Occidental del género *Ictalurus*, aportando conocimiento a la escasa información genética disponible. La inferencia filogenética obtenida del gen *CYTB* resultó en la confirmación de la monofilia de la familia, del género *Ictalurus* y del clado *punctatus*, además colocó al clado *pricei* de las cuencas de los ríos Yaqui y Fuerte, con el clado hermano de los bagres nativos de los ríos Sinaloa, Culiacán y San Lorenzo, colocando a estos clados muy cercanos al bagre lobo (*Ictalurus lupus*) de la Mesa Central y al bagre del Río Conchos del norte de México.

La inferencia filogenética a partir de genomas mitocondriales completos se convierte en una herramienta que podría esclarecer con mayor contundencia las relaciones filogenéticas de los bagres nativos de México y más aún, de la identidad específica y hermandad de los bagres del género *Ictalurus* en el Noroeste México.

### **III. HIPÓTESIS**

La secuencia y estructura del genoma mitocondrial del bagre Yaqui, *Ictalurus pricei* nativo del Noroeste de México revela su identidad específica y geográfica, así como y sus relaciones filogenéticas.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Obtener la secuencia nucleotídica completa y la estructura del genoma mitocondrial del bagre Yaqui, *Ictalurus pricei*, nativo del Noroeste de México, proporcionando información sobre su origen, sus relaciones filogenéticas y de especiación.

### **4.2. Objetivos particulares**

1. Obtener la secuencia nucleotídica completa del genoma mitocondrial del bagre Yaqui, *Ictalurus pricei* en dos regiones geográficas.
2. Conocer la estructura del genoma mitocondrial del bagre Yaqui.
3. Comparar la estructura de su genoma con otras especies de bagre reportadas en el GenBank.
4. Evaluar las relaciones filogenéticas existentes utilizando los análisis filogenéticos de distancias genéticas, máxima parsimonia y máxima verosimilitud.

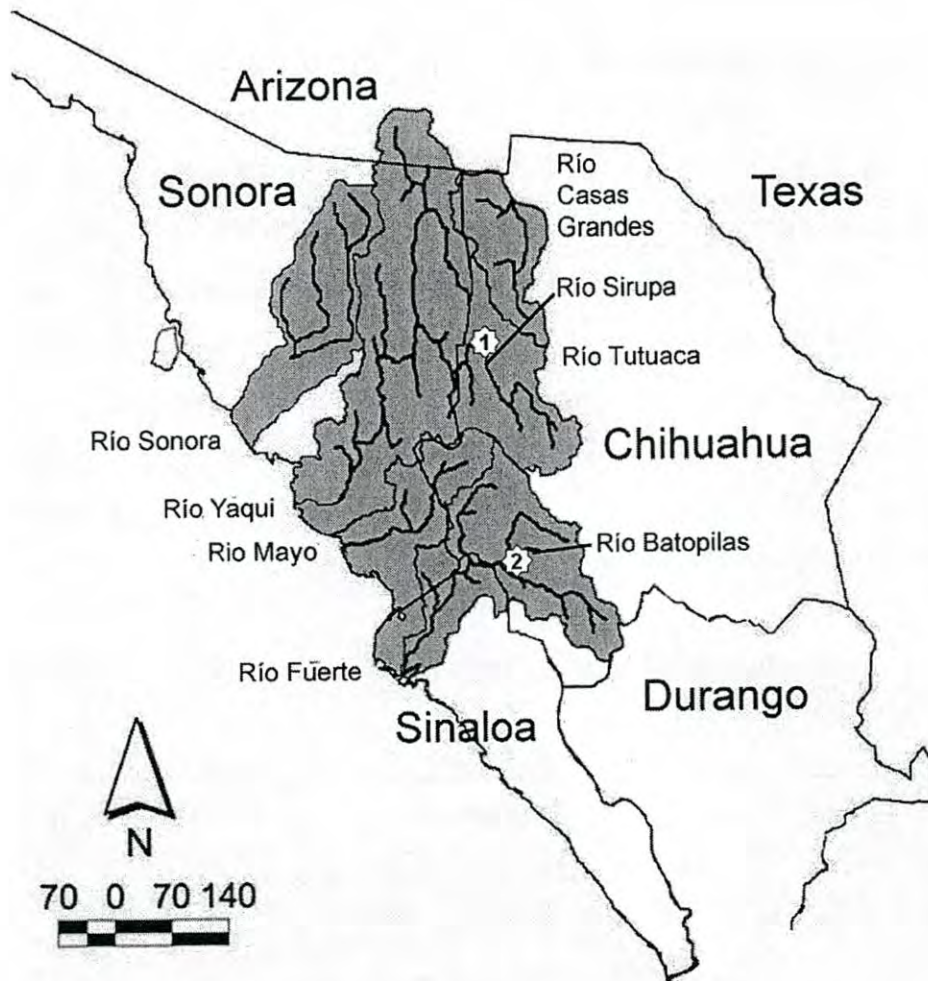
## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Obtención de muestras

Los tejidos de los ejemplares de bagres nativos para la obtención del ADN fueron recolectados dentro del estudio de la variabilidad genética de los bagres nativos del Noroeste de México (Varela-Romero, 2007) bajo el Permiso de Pesca de Fomento No. DGOPA.03947.250406.1606 otorgado por la CONAPESCA/SAGARPA. Se seleccionaron las muestras disponibles de las cuencas de los ríos Yaqui y Fuerte (Tabla 1, Figura 3). De cada espécimen recolectado se obtuvo una muestra de 5 g de la porción interior de la aleta pélvica derecha, se fijó con etanol al 95 % y etiquetó individualmente. El resto del cuerpo de los ejemplares de referencia fue fijado con formol al 10 % y transferidos a alcohol etílico al 50 % para su preservación y fueron depositados en la Colección Ictiológica del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

**Tabla 1.-** Lista de localidades de recolecta de los bagres nativos utilizados en este estudio. Las localidades fueron tomadas de Varela-Romero (2007). USFWS = United States Fish and Wildlife Service, AZGFD = Arizona Game and Fish Department, mnsn = metros sobre el nivel del mar.

Localidad	Coordenadas	Elevación (msnm)	Fecha	Recolectores
Localidad 1. Chihuahua, México. Cuenca del Yaqui, Río Sirupa en el Rancho Huápoca.	29° 08.616'N 108° 18.266'O	1,380	5 de abril, 1990	Personal del USFWS/AZGFD
Localidad 2. Chihuahua, México. Cuenca del Fuerte, Río Batopilas, 15 km al Este del poblado de Batopilas.	27° 05.923'N 107° 40.773'O	658	20 de febrero, 2005	J. Brooks, A. Varela-Romero, N. Smith y R. Rosas-Valdez.



**Figura 3.-** Localización geográfica de las localidades de recolecta del bagre Yaqui *Ictalurus pricei* utilizados en este estudio.

## 5.2. Extracción y análisis del ADN

El ADN total se obtuvo de un ejemplar de cada cuenca hidrológica a partir de 25 mg tejido de las aletas trituradas con un homogenizador de Kontes para microtubos. El homogenizado fue digerido con proteinasa K y ARNasa para obtener el ADN que es precipitado con etanol de acuerdo a lo especificado en el kit QIAamp DNA Mini Kit de la compañía QIAGEN. La calidad y pureza del ADN se determinó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop ND-

1000 con absorbancias de 260 y 280 nm. La calidad se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### 5.3. Uso y diseño de oligonucleótidos

Para la amplificación del genoma mitocondrial completo del espécimen de cada cuenca hidrológica se utilizó la información disponible para el gen *CYTB*, la región control y la unidad *12sARNr* del bagre Yaqui (Varela-Romero, 2007; Vega-Heredia, 2007). Bajo la técnica de “primer walking”, se diseñaron oligonucleotidos para los genes *COI* y *NDH4* tomadas de las secuencias disponibles para *I. punctatus* (Número de acceso GenBank AF482987). A partir de las secuencias obtenidas, se diseñaron nuevos oligonucleótidos posicionados en diferentes regiones del genomas mitocondrial para completar la secuencia nucleotídica completa del ADNmt del bagre Yaqui (Tabla 2).

**Tabla 2.-** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación del genoma mitocondrial del bagre Yaqui.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición de inicio
1.- COXIII Fw	AGGAGAACGCAAACAAGCAG	10113
2.- COXIII Rv	GTTGAGCCGATGATGACGTG	10294
3.- NDH4 Fw	TTAAAGTTAGTACGAATGACTTCC	10451
4.- NDH4 Rv	GTTTTGGTGTAGGAGGAGCAG	11733
5.- 16sRNAr Fw	CCCTCACCTTTKGCATCATGA	2183
6.- 16sRNAr Rv	CGGTCTGAACTAGATCACGTA	3485
7.- NDH5 Fw	TGACCATTACTCACTGATTTTCACC	13064
8.- CYTB Ri	GAGGACAAATRTCATTCTGAGG	15641
9.- COXI Fw	CCTATTTGTCTGAGCCGTCC	6880
10.- COXI Rv	GTGTCGTGTATTGTGTATCCTG	7558
11.- RNAt-tyr Fw	AAACCTTTGTTTCATGGAGCTAC	6281
12.- RNtAser Rv	AGTGGTTATGTAAGTGGCTTGA	7943
13.- NDH4 Fw	TGTGGCTGACGGATGAGTAG	12102
14.- RNAt-val Rv	TACACCGAGAAGACATCC	1942
15.- RNAt-leu Fw	TTTACCATGCTCTGCCAC	3665
16.- RNAt-gly Rv	TTAAAGTTAGTACGAATGACTTCC	10451
17.- NDH1 Fw	CCGGAGGTCCTTTCGCAC	4380
18.- NDH2 Rv	CATGTGGAAAGTGCATTGCTC	4485

...continúa.



**Tabla 2. Continuación.**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición de inicio</b>
19.- 12s/16s Fw	CCGTCACTCTCCCCTCTGTA	1798
20.- 12s/16s Rv	TCCTGGTGAGGTTGTGTCCT	2505
21.- 16s/N1 Fw	GACGAGAAGACCCTTTGGAG	3111
22.- 16s/N1 Rv	GCTAGACTAGAGAGGGCCAGAA	4068
23.- N1Fw	ACTGGCCCTAACCCCTAGCA	3961
24.- N1Rv	GATGACGTAGGGGCTCATTG	4920
25.- N2/COI Fw	GCCCCAACTAACCGTGCTA	5494
26.- N2/COI Rv	AGCTAGTTCTGCCCGGATG	6458
27.- COI/COII Fw	GCCTAACTGGCATCGTCCTA	7389
28.- COI/COII Rv	TACTGCTGGGAGGATGGTTC	8260
29.- COII Fw	ACGGCTCAATGGCACATC	8040
30.- COII Rv	GGAGGGTGAGAGCAATAGCA	9050
31.- ATP8 Fw	CCCAACCGCCTCTAGTGATA	8795
32.- ATP8 Rv	CAGCTACTGCTCCGGTTAGG	9724
33.- CXIII Fw	CCCTCTAGCCCTCGGAGTC	9430
34.- CXIII Rv	TTGAGCCGTYCACTCCGTCT	10240
35.- N3d Fw	AGACGGAGTRTACGGCTCAA	10221
36.- N3 Rv	AGTAGGGCTGAAAGCAGGTG	11021
37.- N4L Fw	GCAGGCTTAGCCCTTCTAGT	11165
38.- N4L Rv	GGCCTCGTTGGGACATTAAG	12474
39.- N4/5 Fw	CACTAATTACCGCGGCCTAC	12421
40.- N4/5 Rv	ACTGGGGTTGGGCCTTCTAT	13549
41.- N5dFw	ATCTTGGCTGTCYACAGGAA	13470
42.- N5Rv	GATGGAGACCTTTGGGTCCT	14517
43.- N5/6 Fw	CCATGGCAGTTACGATCCTG	14290
44.- N5/6d Rv	GGGGCGGGTAGWTCAATTAG	15286

#### **5.4. Amplificación por PCR**

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando las esferas PCR PuRe Taq Ready-to-Go (GE Healthcare), cada esfera contiene 200  $\mu$ M de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.25 unidades de PuRe Taq ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, estabilizadores y BSA. Se agregaron 16  $\mu$ l de agua estéril Milli-Q a cada esfera repartiendo el producto en dos tubos de 0.2 ml en partes iguales con 8  $\mu$ l cada uno, se colocó 1.25  $\mu$ l de cada oligonucleótido a cada tubo con el producto de agua y perla, finalmente se añadieron 2  $\mu$ l de ADN para así obtener un volumen final de 12.5  $\mu$ l en cada tubo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador BioRad DNA Engine PTC 200,

donde se diseñó un programa de PCR en gradiente para cada par de oligonucleótidos buscando la mejor temperatura de alineación. El programa consta de una desnaturalización inicial por 5 minutos a 94° C, seguida de 34 ciclos de 50 segundos a 94° C, 1 minuto en gradiente de 45 a 65° C de acuerdo a la temperatura de alineamiento del par de oligonucleótidos utilizados y 1 minuto a 72° C. La extensión final se realizó a 72° C durante 10 minutos. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20° C y utilizados para corroborar el tamaño del producto de PCR por medio de una electroforesis.

### **5.5. Electroforesis de los productos de PCR**

Para determinar si el producto de PCR obtenido era del tamaño esperado para cada gen, se tomó una muestra de 2 µl, se realizó una electroforesis y se visualizó utilizando geles de agarosa (Sigma-Aldrich) preparados al 1% con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen) para comparar con el peso molecular de la banda obtenida. Las imágenes de los geles expuestos a luz UV fueron capturadas con la ayuda de un fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio\_Imaging System).

### **5.6. Secuenciación y análisis del genoma**

Los productos de PCR del tamaño esperado para cada gen fueron enviados a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea) según las especificaciones de la compañía para su purificación y secuenciación en ambos sentidos de la cadena de ADNmt. Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el programa Chromas Pro (versión 1.6) y alineadas por medio de Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Se utilizó el análisis BLAST (Altschul *et al.* 1990) para comparar las secuencias obtenidas con las existentes en GenBank. Las secuencias codificadoras de proteínas fueron deducidas a su expresión polipeptídica a través del software en línea Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). La estructura secundaria de los ARNt se obtuvo utilizando el programa en línea tRNAscan-SE 1.21 (Lower y Eddy, 1997).

## 5.7. Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó a partir del concatenado de los genes codificadores de proteínas de los dos genomas mitocondriales de bagre Yaqui obtenidos y se incluyeron otros peces Siluriformes disponibles en el GenBank secuenciados y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como grupo externo (Tabla 3). La construcción de los árboles filogenéticos se realizó en el programa PAUP\* versión 4.0b10 (Swofford, 2002). Las hipótesis filogenéticas se resolvieron a partir de los criterios de distancias genéticas, máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML). Se utilizó el análisis de Neighbor Joining (NJ) para distancias genéticas bajo el criterio de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980) con 1000 réplicas aleatorias de bootstrap para encontrar la topología de las relaciones entre los organismos analizados.

Para el método de MP se obtuvo el árbol más parsimonioso con la técnica de bisección-reconexión de árboles (TBR por sus siglas en inglés) a partir de una búsqueda heurística, donde todos los caracteres fueron igualmente ponderados utilizando 1000 réplicas aleatorias de bootstrap no paramétrico (10 adiciones al azar). Se calcularon los índices de retención y consistencia utilizando PAUP\* (Swofford, 2002). Previo al análisis de máxima verosimilitud se determinó que el modelo más óptimo de sustitución de nucleótidos para el análisis de ML fue el GTR+G+I obtenido mediante las pruebas de tasa jerárquica de verosimilitud (hLRTs por sus siglas en inglés) y el criterio de información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés) (Posada y Buckley, 2004) obtenidos en ModelTest 3.2 (Posada y Crandall, 1998). Este modelo se utilizó para calcular los valores y la topología del árbol a partir de una búsqueda de ML utilizando el intercambio de ramas (branch-swapping search) para un árbol de alta verosimilitud con los parámetros recuperados en el programa PAUP\* (Swofford, 2002). El árbol fue utilizado como el árbol de inicio para un análisis de bootstrap no paramétrico de 1000 pseudo réplicas para estimar el soporte de nodos en el análisis de ML. Los árboles fueron editados utilizando el programa FigTree versión 1.3.1.

**Tabla 3.-** Especies utilizadas para el análisis filogenético.

<b>Especie</b>	<b>Número de acceso en GenBank</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	HM641815	Siluriformes	Bagridae
<i>Pseudobagrus tokiensis</i>	AB054127	Siluriformes	Bagridae
<i>Leiocassis longirostris</i>	GU596454	Siluriformes	Bagridae
<i>Pelteobagrus nitidus</i>	HM746659	Siluriformes	Bagridae
<i>Pseudobagrus ussuriensis</i>	KC188782	Siluriformes	Bagridae
<i>Pseudobagrus truncatus</i>	JX867259	Siluriformes	Bagridae
<i>Ictalurus punctatus</i>	AF482987	Siluriformes	Ictaluridae
<i>Cranoglanis boudierius</i>	AY898626	Siluriformes	Cranoglanididae
<i>Pangasianodon gigas</i>	AY762971	Siluriformes	Pangasiidae
<i>Pangasius larnaudii</i>	AP012018	Siluriformes	Pangasiidae
<i>Silurus asotus</i>	AP012022	Siluriformes	Siluridae
<i>Silurus meridionalis</i>	JX087350	Siluriformes	Siluridae
<i>Silurus glanis</i>	AM398435	Siluriformes	Siluridae
<i>Auchenoglanis occidentalis</i>	AP012005	Siluriformes	Bagridae
<i>Pareutropius debauwi</i>	AP012017	Siluriformes	Schilbeidae
<i>Synodontis schoutedeni</i>	AP012023	Siluriformes	Mochokidae
<i>Pimelodus pictus</i>	AP012019	Siluriformes	Pimelodidae
<i>Heteropneustes fossilis</i>	AP012013	Siluriformes	Heteropneustidae
<i>Centromochlus perugiae</i>	AP012024	Siluriformes	Auchenipteridae
<i>Liobagrus marginatoides</i>	KC473938	Siluriformes	Amblycipitidae
<i>Liobagrus kingi</i>	KC193779	Siluriformes	Amblycipitidae
<i>Liobagrus obesus</i>	NC_008232	Siluriformes	Amblycipitidae
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NC_001717	Salmoniformes	Salmonidae

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Organización del genoma

Las secuencias nucleotídicas completas de los genomas mitocondriales se obtuvieron de los especímenes de *I. pricei* de la Cuenca del Río Yaqui y de la Cuenca del Río Fuerte, resultando en dos haplotipos geográficos del genoma para la especie. El genoma mitocondrial de los dos haplotipos del bagre Yaqui mostró ser una molécula circular de 16,503 pares de bases, con una región control encargada de la replicación y transcripción de este genoma, 13 genes codificadores de proteínas, dos ARNr's y 22 ARNt's. De acuerdo a Waldbieser *et al.* (2003) la cadena pesada codifica 27 genes, mientras que la ligera lo hace para 10 (Tabla 4).

La identidad de cada gen fue confirmada usando el análisis BLAST (Altschul *et al.* 1990) a partir del genoma mitocondrial completo del bagre de canal *I. punctatus* (No. de acceso GenBank AF482987), siendo la especie con mayor identidad con el bagre Yaqui por ser congénéricos y pertenecientes al mismo clado (Lundberg, 1992; Varela-Romero, 2007; Vega-Heredia, 2007). El arreglo de genes resultó ser el típico para la mayoría de los vertebrados con un orden idéntico de genes, especialmente con el bagre de canal (Waldbieser *et al.* 2003). Todos los genes codificadores de proteína utilizan el codón de inicio ATG, excepto en *COI* que utiliza el codón GTG. Cinco marcos de lectura abierta terminan con el codón TAA (*ND1*, *COI*, *ATP8*, *ND4L* y *ND5*) y dos terminan con TAG (*ND2* y *ND3*). El resto de los genes codificadores de proteína terminan con el codón incompleto T (*COII*, *COIII*, *ND4*, *ND6* y *CYTB*). Estos codones son aparentemente completados por una poliadenilación post-transcripcional como lo mencionan Ojala *et al.* (1981) en otros vertebrados.

**Tabla 4.-** Organización del genoma mitocondrial completo de *I. pricei* basado en el análisis de dos haplotipos geográficos. H = cadena pesada, L, cadena ligera.

Gen	Abreviación	Posición		Tamaño	Cadena	Codón	
		Inicio	Terminación			Inicio	Terminación
Región control	<i>RC</i>	1	888	888	-		
ARNt Fenilalanina	F	889	958	70	H		
<i>12S</i> ARN Ribosomal	<i>12S</i>	959	1913	955	H		
ARNt Valina	V	1914	1985	72	H		
<i>16S</i> ARN Ribosomal	<i>16S</i>	1986	3645	1660	H		
ARNt Leucina	L	3646	3720	75	H		
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 1	<i>ND1</i>	3721	4696	976	H	ATG	TAA
ARNt Isoleucina	I	4697	4768	72	H		
ARNt Glutamina	Q	4838	4768	71	L		
ARNt Metionina	M	4838	4907	70	H		
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 2	<i>ND2</i>	4908	5954	1047	H	ATG	TAG
ARNt Triptófano	W	5953	6024	72	H		
ARNt Alanina	A	5995	6027	69	L		
ARNt Asparagina	N	6169	6097	73	L		
ARNt Cisteína	C	6267	6201	67	L		
ARNt Tirosina	Y	6339	6270	70	L		
Citocromo Oxidasa 1	<i>COI</i>	6341	7891	1551	H	GTG	TAA
ARNt Serina	S	7962	7892	71	L		
ARNt Ac. Aspártico	D	7967	8039	73	H		
Citocromo Oxidasa 2	<i>COII</i>	8054	8744	691	H	ATG	T-
ARNt Lisina	K	8745	8818	74	H		
<i>ATP</i> sintasa 8	<i>ATP8</i>	8819	8987	159	H	ATG	TAA
<i>ATP</i> sintasa 6	<i>ATP6</i>	8978	9660	684	H	ATG	TA
Citocromo Oxidasa 3	<i>COIII</i>	9661	10444	784	H	ATG	T-
ARNt Glicina	G	10445	10516	72	H		
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 3	<i>ND3</i>	10517	10867	351	H	ATG	TAG
ARNt Arginina	R	10866	10935	70	H		
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 4L	<i>ND4L</i>	10936	11232	290	H	ATG	TAA
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 4	<i>ND4</i>	11226	12606	1381	H	ATG	T-
ARNt Histeina	H	12607	12676	70	H		
ARNt Serina	S	12677	12745	64	H		
ARNt Leucina	L	12746	12818	73	H		
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 5	<i>ND5</i>	12819	14642	1820	H	ATG	TAA
<i>NADH</i> Deshidrogenasa 6	<i>ND6</i>	14639	15154	516	L	ATG	T-
ARNt Ac. Glutámico	E	15223	15155	69	L		
Citocromo <i>b</i>	<i>CYTB</i>	15225	16362	1138	H	ATG	T-
ARNt Treonina	T	16363	16434	72	H		
ARNt Prolina	P	16433	16503	70	L		

De los trece genes codificadores de proteínas tres secciones (*ATP8-ATP6*, *ND4L-ND4*, *ND5-ND6*) se encontraron sobrepuestas en ambos sentidos de sus secuencias (Tabla 4) como se ha visto en otros genomas de bagres (Waldbieser *et al.* 2003; Peng *et al.* 2006;

Jondeung *et al.* 2007; Kartavtsev *et al.* 2007). Al interior de la variación en la secuencia de los genes de los dos haplotipos geográficos de las cuencas de los ríos Yaqui y Fuerte, sólo el gen *ATP8* y 20 ARNTt's resultaron idénticos.

## 6.2. Composición de bases

El genoma mitocondrial total de *I. pricei* poseen un contenido de A+T de 55.48%, resultando ser muy similar al de *I. punctatus* con 55.38% y menor en contenido respecto a *C. boudierius* (56.70 %) y *P. gigas* (55.92%). El porcentaje de A+T para los genes que codifican para proteínas en el genoma mitocondrial de *I. pricei* es de 55.02% (Tabla 5) en promedio para las dos cuencas analizadas, donde 55% corresponde al haplotipo de la Cuenca de Río Yaqui y el 55.05% al haplotipo de la Cuenca del Río Fuerte, resultando ser menores, pero muy similares respecto al de *I. punctatus* con 55.84% (Waldbieser *et al.* 2003).

**Tabla 5.-** Contenido de porcentaje de A+T en el genoma mitocondrial completo de *I. pricei* basado en el análisis de dos haplotipos geográficos. Las abreviaciones de los genes fueron tomadas de la tabla 4.

Gen	<i>I. pricei</i> Río Yaqui	<i>I. pricei</i> Río Fuerte	<i>I. punctatus</i>	<i>C. boudierius</i>	<i>P. gigas</i>
<i>ND1</i>	56.10	55.94	55.69	49.23	55.18
<i>ND2</i>	53.77	53.97	53.68	57.12	53.16
<i>COI</i>	54.22	54.29	53.71	57.58	55.51
<i>COII</i>	55.86	55.57	55.43	58.76	56.73
<i>ATP8</i>	59.52	59.52	60.71	66.07	63.10
<i>ATP6</i>	56.81	57.39	54.33	59.21	59.21
<i>COIII</i>	54.08	54.08	53.72	54.21	53.12
<i>ND3</i>	51.00	51.85	51.85	58.69	54.13
<i>ND4L</i>	53.54	53.20	52.53	51.18	51.18
<i>ND4</i>	55.76	55.61	56.19	58.22	56.05
<i>ND5</i>	57.46	57.35	57.29	58.13	57.20
<i>ND6</i>	52.13	52.13	53.29	55.88	54.34
<i>CYTB</i>	54.75	54.75	54.48	57.29	55.45
Promedio	55.00	55.05	54.84	57.04	55.72

Los valores que presentan *C. boudierius* (57.04 %, Peng *et al.* 2006) y *P. gigas* (55.72 %, Jondeung *et al.* 2007) son mayores que los registrados para nuestros bagres nativos. La composición de A+T en la región control resultó ser de 64.08% y para las unidades ribosomales *12sARNr* y *16sARNr* fue de 50.89% y 55.36% respectivamente en promedio para los dos haplotipos geográficos detectados.

### 6.3. Genes codificadores de proteína

Los 13 genes codificadores de proteína detectados para ambos haplotipos de *I. pricei* presentaron una longitud y un uso de codones conservada entre sí y con respecto a la del bagre de canal (Tabla 6). Estos elementos conservados aparentemente representan evidencia de la monofilia del género al interior de la familia de acuerdo a los genes mitocondriales utilizados por Sullivan *et al.* (2006) y Varela-Romero (2007).

**Tabla 6.-** Longitud y codones de inicio y terminación en los genes que codifican para proteínas del genoma mitocondrial completo de *I. pricei* basado en el análisis de dos haplotipos geográficos. Los valores y codones en negritas representan diferencias de los haplotipos de *I. pricei* e *I. punctatus* con el resto de los Siluriformes analizados. Las abreviaciones de los genes fueron tomadas de la tabla 4.

Gen	<i>I. pricei</i> Río Yaqui	<i>I. pricei</i> Río Fuerte	<i>I. punctatus</i>	<i>C. boudierius</i>	<i>P. gigas</i>
<i>ND1</i>	975 ATG/TAA	975 ATG/TAA	975 ATG/TAA	975 ATG/ <b>TAG</b>	975 ATG/TAA
<i>ND2</i>	1047 ATG/TAG	1047 ATG/TAG	1047 ATG/TAG	1047 ATG/TAG	<b>1044</b> ATG/TA
<i>COI</i>	1551 GTG/TAA	1551 GTG/TAA	1551 GTG/TAA	1551 GTG/ <b>TAG</b>	1551 GTG/TAA
<i>COII</i>	691 ATG/T-	691 ATG/T-	691 ATG/T-	691 ATG/T-	691 ATG/T-
<i>ATP8</i>	168 ATG/TAA	168 ATG/TAA	168 ATG/TAA	168 ATG/TAA	168 ATG/TAA
<i>ATP6</i>	684 ATG/TAA	684 ATG/TAA	684 ATG/TAA	684 ATG/ <b>TAA</b>	684 ATG/TA
<i>COIII</i>	784 ATG/T-	784 ATG/T-	784 ATG/T-	784 ATG/T-	<b>785</b> ATG/TA
<i>ND3</i>	351 ATG/TAG	351 ATG/TAG	351 ATG/TAG	351 ATG/TAG	351 ATG/TAG
<i>ND4L</i>	297 ATG/TAA	297 ATG/TAA	297 ATG/TAA	297 ATG/TAA	297 ATG/TAA
<i>ND4</i>	1381 ATG/T-	1381 ATG/T-	1381 ATG/T-	1381 ATG/T-	1381 ATG/T-
<i>ND5</i>	1824 ATG/TAA	1824 ATG/TAA	1824 ATG/TAA	<b>1827</b> ATG/TAA	<b>1827</b> ATG/TAA
<i>ND6</i>	516 ATG/T-	516 ATG/T-	516 ATG/T-	<b>519</b> ATG/ <b>TAG</b>	<b>519</b> ATG/ <b>TAG</b>
<i>CYTb</i>	1138 ATG/T-	1138 ATG/T-	1138 ATG/T-	1138 ATG/T-	1138 ATG/T-



Estas variables génicas también presentaron variación al interior del representante de la familia hermana de los ictalúridos. Peng *et al.* (2006) registró una longitud mayor que la registrada por este estudio para los genes *ND5* y *ND6*, así como el uso del codón de terminación TAG para éste último gen y para *ND1* y *COI*, representando con esto una acumulación de diferencias estructurales con respecto a los representantes de la familia Ictaluridae de este estudio. Con respecto a *P. gigas*, esta especie resultó con mayor variación estructural en los genes codificadores de proteínas con respecto a los ictalúridos y al representante de la familia más cercana al grupo de interés (Tabla 4).

#### 6.4. Unidades Ribosomales

Las unidades ribosomales son similares entre todas las especies de vertebrados y se consideran más conservadas en comparación a los genes codificadores de proteínas (Nei, 1987; Kocher y Stepien. 1997; Li, 1997). Las unidades *12sARNr* y *16sARNr* se encuentran flanqueadas por los ARNt de Fenilalanina y Leucina y separados por el ARNt de Valina (Kogelnik *et al.* 1998; Nohara *et al.* 2005). A pesar de la similitud de estas unidades entre vertebrados se han observado diferencias en cuanto a sustituciones y tamaño en diferentes órdenes de peces (Kim *et al.* 2004, 2005; Nagase *et al.* 2005; Kartavtsev *et al.* 2007).

Al comparar la longitud de las secuencias de la unidad ribosomal *12sARNr* de *I. pricei* de 954 pb, resultó mayor en una base que la de *I. punctatus* al interior de la familia Ictaluridae y también mayor en siete bases que la registrada para *C. boudierius* como el pariente más cercano a los ictalúridos. Para otros Siluriformes como *P. gigas* y *L. obesus* la longitud de su unidad *12S* resultó mayor en cuatro y dos bases que la del bagre Yaqui, respectivamente (Tabla 5). El contenido de A+T para los genes ribosomales *12S* del genoma mitocondrial de *I. pricei* fue de 50.94% (Tabla 7) en promedio para las dos cuencas analizadas, resultando ser mayor pero muy similar con el de *I. punctatus* con 50.79% (Waldbieser *et al.* 2003). Los valores que presentan el resto de los Siluriformes fue mucho mayor (*C. boudierius* 52.48 %, Peng *et al.* 2006; *P. gigas* 52.87%, Jondeung *et al.* 2006; *L. obesus* 52.93%, Kartavtsev *et al.* 2007) que las detectadas para los ictalúridos.

La unidad 16S registró el mismo patrón de variación al interior de la familia y con el resto de los Siluriformes estudiados. El 16S de *I. pricei* es de la misma longitud que el de *I. punctatus*, pero mayor que el *C. boudierius* (Peng *et al.* 2006) y estos tres son menores que los 1,674 pb y 1,666 pb detectadas en *P. gigas* y *L. obesus*, respectivamente (Jondeung *et al.* 2006; Kartavtsev *et al.* 2007). El porcentaje de A+T del 16S fue de 55.36%, al ser comparado con *I. punctatus*, *P. gigas* y *C. boudierius* este fue muy similar con 55.66%, 55.85% y 55.07% respectivamente, mientras que *L. obesus* presentó un valor más alto de 56.54% (Tabla 5). Ambas unidades ribosomales han mostrado poseer numerosas sustituciones entre especies de peces (Kartavtsev *et al.* 2007), sugiriendo su uso para propósitos taxonómicos y filogenéticos.

**Tabla 7.-** Comparación entre las unidades 12sARNr y 16sARNr del genoma mitocondrial completo de *I. pricei* basado en el análisis de dos haplotipos geográficos.

	12sARNr		16sARNr	
	Tamaño (pb)	A+T (%)	Tamaño (pb)	A+T (%)
<i>I. pricei</i>	954	50.94	1660	55.36
<i>I. punctatus</i>	953	50.79	1660	55.66
<i>C. boudierius</i>	947	52.48	1636	55.07
<i>P. gigas.</i>	959	52.87	1674	55.85
<i>L. obesus</i>	956	52.93	1666	56.54

### 6.5. Genes no codificadores de proteínas

La región control está flanqueada por los ARNt's de Prolina y Fenilalanina y presentó 888 pares de bases en los dos genomas de los haplotipos geográficos obtenidos del bagre Yaqui. El contenido de A+T para ambos genomas resultó ser de 64.4% para *I. pricei* del Río Yaqui y 64.08% para el bagre Yaqui del Río Fuerte, siendo mayor que el de su congénico *I. punctatus* con 63.28%. La región control presenta una alta variabilidad y está dividida en tres dominios (Walberg y Clayton 1981; Saccone *et al.* 1991; Shadel y Clayton, 1997). En el dominio derecho, adyacente al gen ARNt de Fenilalanina, se localizan los elementos *cis*

(secuencias) llamados Bloques de Secuencias Conservadas (CSBs por sus sigla en inglés, Figura 4) asociados con el inicio de la síntesis de la replicación de la cadena pesada y la caja TATA que es el promotor para la transcripción de la cadena pesada por la ARN polimerasa II (Walberg y Clayton, 1981; Saccone *et al.* 1991; Shadel y Clayton, 1997; Taanman, 1999).

En los dominios izquierdo y central contienen los elementos *cis* asociados a la terminación de la síntesis de la cadena pesada (TAS por sus siglas en inglés, Figura 4; Gresse y Vallejo, 2001; Saccone *et al.* 1991; Shadel y Clayton, 1993). El dominio izquierdo mostró las secuencias palindrómicas repetidas TACAT, ATGTA, encargadas de proporcionar estabilidad al lazo u horquilla, que es una estructura secundaria involucrada en la regulación del número de copias del ADNmt en la replicación (Saccone *et al.* 1991; Sbisa *et al.* 1997; Shadel y Clayton, 1997). El dominio central es uno de los más conservados en la evolución del genoma mitocondrial en vertebrados (Sbisa *et al.* 1997, Saccone *et al.* 1991). La función de este dominio sigue siendo incierta, en un intento de encontrar su función en mamíferos, Sbisa *et al.* (1997) buscaron la presencia de marcos de lectura. Sus resultados y los de Saccone *et al.* (1987) reportan la presencia de posibles marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés) en secuencias de mamíferos, sin embargo la similitud entre las secuencias de aminoácidos es muy baja, concluyendo por lo tanto que su función sigue siendo desconocida.

Todos los elementos reguladores y promotores detectados en el genoma mitocondrial de *I. pricei* para cada haplotipo se encontraron en las mismas posiciones y de acuerdo a lo reportado para esta especie por Vega-Heredia (2007). Además, correspondieron a la misma ubicación y estructura al interior de la región control del bagre de canal *I. punctatus* de acuerdo a Waldbieser *et al.* (2003) (Figura 4).



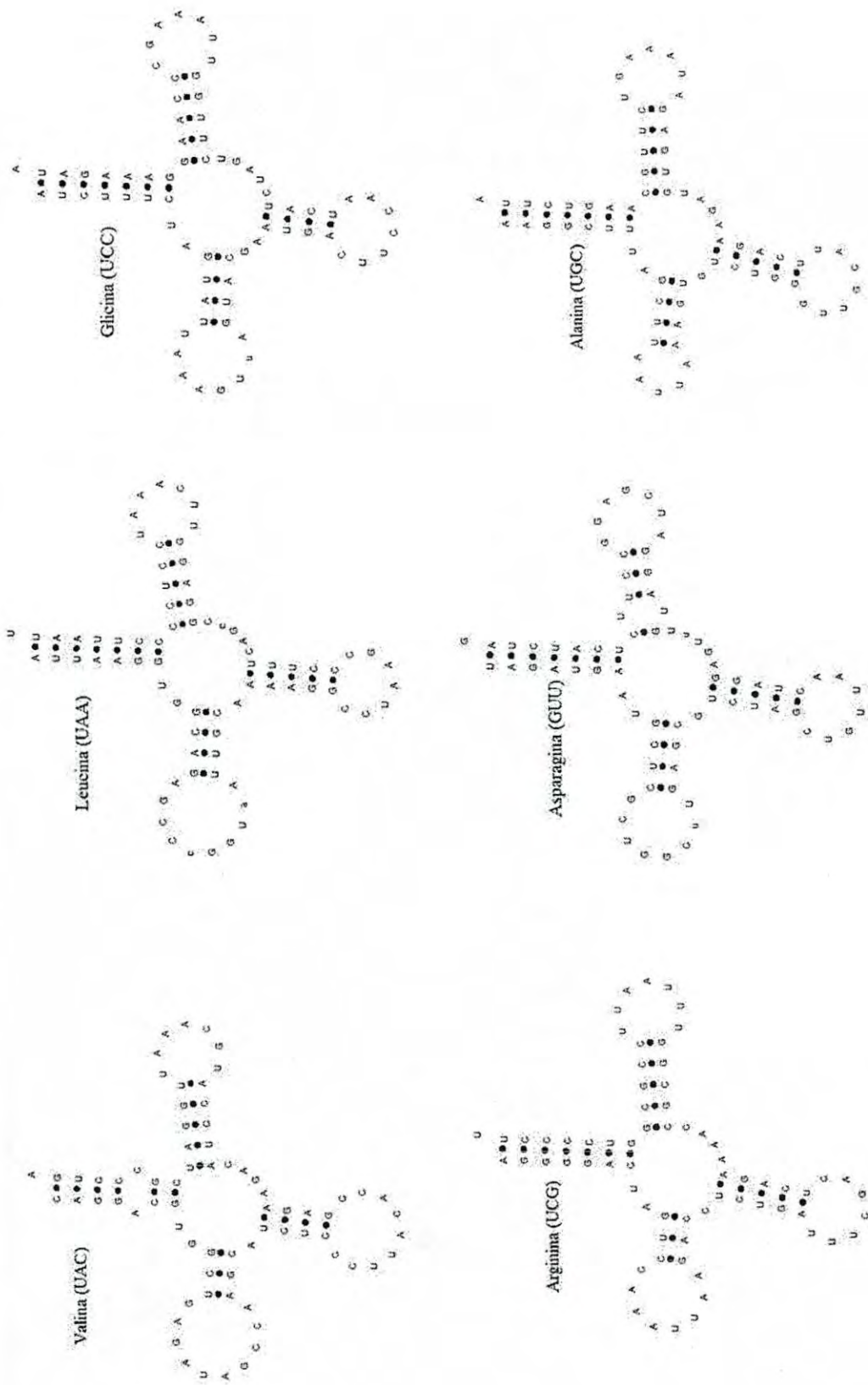
Al igual que en la mayoría de los vertebrados y particularmente en varios peces, se logró detectar la secuencia putativa que da origen a la replicación de la cadena ligera (Taanman, 1999; Kim *et al.* 2004a, 2004b; Nagase *et al.* 2005, Kartavtsev *et al.* 2007) en los dos haplotipos geográficos de bagre Yaqui. La secuencia se observó localizada en una región no codificante del grupo de ARNt's conocida como WANCY por la nomenclatura de una letra de éstos cinco aminoácidos (Triptófano, Alanina, Asparagina, Cisteina y Treonina), flanqueada por los genes de *ND2* y *COI*. La secuencia para el origen de la cadena ligera en el haplotipo del bagre Yaqui del Río Yaqui se detectó utilizando los orígenes reportados por Kartavtsev *et al.* (2007), Peng *et al.* (2006) y Jondeung *et al.* (2006) para otros Siluriformes cercanos a la familia Ictaluridae, resultando en una secuencia de 29 pb (5'-CTTTCCCCGCCTCCCGCCAAAAGGCGGG-3') muy conservada flanqueada por los ARNt de Asparagina y Cisteina. La secuencia del inicio de la replicación de la cadena ligera fue distinta para el haplotipo del Río Fuerte en la posición número 16 de la secuencia registrando Adenina en el lugar de una Guanina, hecho que consiste en una transición con respecto al haplotipo del Río Yaqui. Ambas secuencias del origen de replicación de la cadena ligera resultaron distintas en la posición número 19 registrando una Adenina en lugar de una Citosina con respecto al bagre de canal, *I. punctatus*.

## 6.6. ARNs de Transferencia

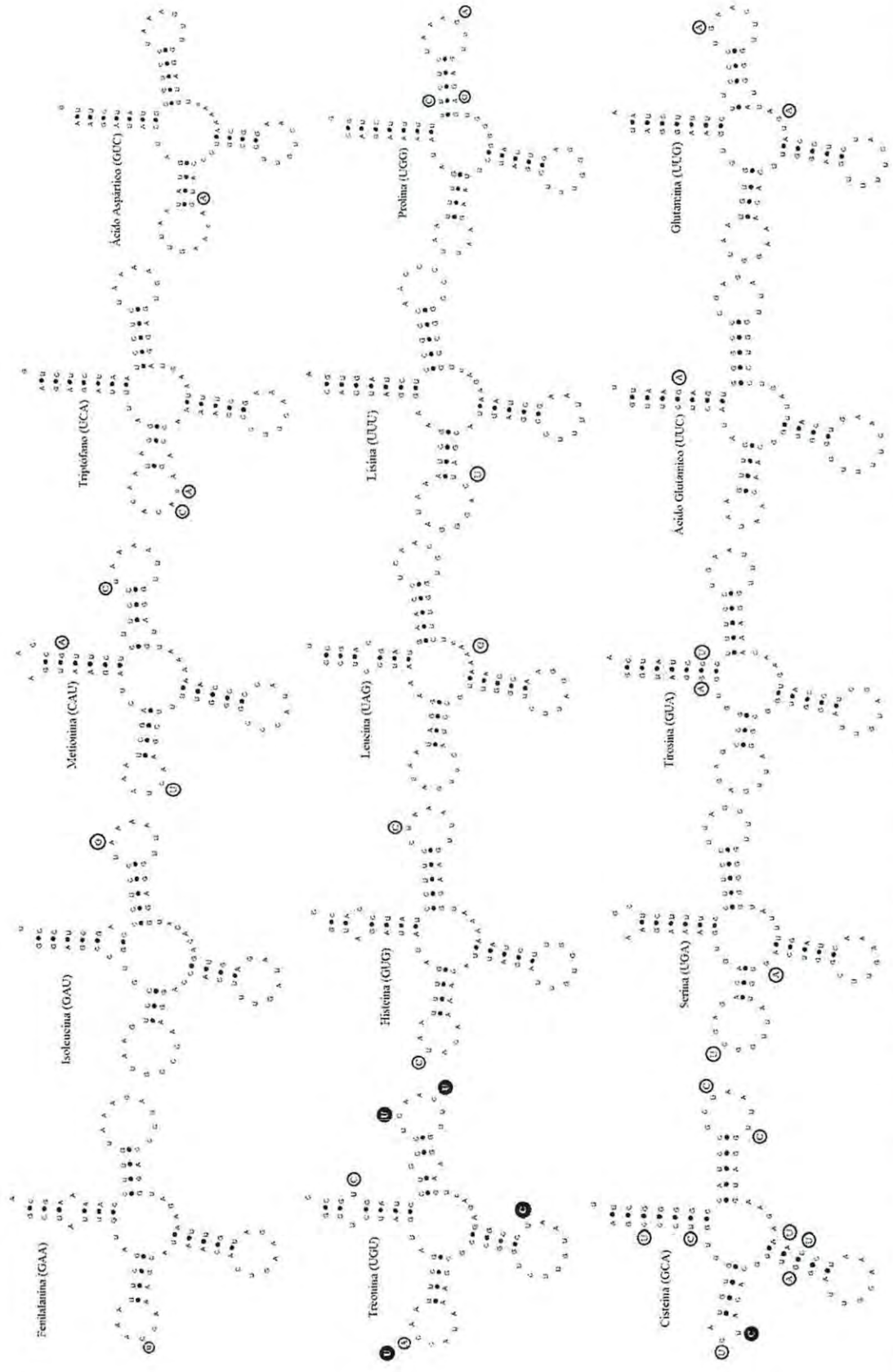
El genoma mitocondrial de *I. pricei* mostró 22 ARNt's al igual que lo reportado para *I. punctatus* por Waldbieser *et al.* (2003) y para otros Siluriformes estudiados (Peng *et al.* 2006; Jondeung *et al.* 2006; Kartavtsev *et al.* 2007) y con un tamaño que va desde 64 a 75 pb (Tabla 4). La estructura secundaria de cada uno de los ARNt's de los dos haplotipos estudiados de *I. pricei* resultó ser la misma comparada con la de *I. punctatus* (Waldbieser *et al.* 2003) y mostraron poseer la misma composición de bases entre las estructuras secundarias en seis ARNt's entre *I. pricei* e *I. punctatus* (Figura 5). Para el resto de los ARNt se observaron diferencias en la composición de las bases en 15 secuencias, sin embargo presentaron las estructuras en cada especie y los mismos anticodones (Figura 6).

La secuencia de bases del ARNt de Serina de *I. pricei* resultó ser diferente a la de *I. punctatus*.

La comparación de los ARNt's de los genomas mitocondriales de *I. pricei* de la Cuenca del Río Yaqui y de la Cuenca del Río Fuerte obtenidos en el presente estudio mostró diferencia intraespecífica en los ARNt's de Cisteina y Treonina sugiriendo diferencias geográficas al igual que otros genes de estos haplotipos (Figura 6). Durante el análisis no fue posible predecir la estructura secundaria del ARNt's de Serina de *I. pricei* ya que carece del brazo "DHU" como ya ha sido observado en otras especies de peces (Shi *et al.* 2011; Yun *et al.* 2012). Por lo general, la estructura secundaria del ARNt de Serina sólo posee un bucle sin tallo o en ocasiones un tallo sin bucle. Probablemente por esta razón, el brazo DHU se creía perdido en muchos peces (Lee y Kocher, 1995; Miya y Nishida, 1999). El ARNt's de Serina de *I. pricei* fue localizado por su conservada posición entre los ARNt's de Histidina y Leucina.



**Figura 5.-** Estructuras secundarias conservadas entre los 2 haplotipos geográficos de *I. pricei* e *I. punctatus*.



**Figura 6.-** Estructura secundaria de los ARNt del bagre Yaqui comparada con la de *I. punctatus*. Los círculos blancos representan las diferencias en composición de bases con *I. punctatus* y los círculos negros representan la diferencia entre *I. pricei* del Río Fuerte.



## 6.7. Análisis Filogenético

Las relaciones filogenéticas de once familias de bagres incluyendo Ictaluridae se determinaron a partir del concatenado de las secuencias nucleotídicas que codifican para proteínas de sus genomas mitocondriales completos, utilizando a un miembro del Orden Salmoniformes como grupo externo (Tabla 3). Cuatro mil seiscientos ochenta y uno de 11,593 bases de las secuencias nucleotídicas alineadas fueron parsimoniosamente informativas. La construcción de las hipótesis filogenéticas realizada arrojaron arboles con topologías y soportes de nodos muy similares entre sí para los criterios de Neighbor Joining (NJ) con Kimura 2 parámetros, máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) (Figuras 7, 8 y 9). Sólo el árbol de NJ compromete la topología de las hipótesis de los otros dos criterios al mostrar a los miembros de las familia Siluridae en politomia con el clado del grupo interno del análisis (Ictaluridae) y sus familias hermanas (Cranoglanididae y Pangasidae, Figuras 7, 8 y 9). De la misma forma, las familias de Siluriformes menos relacionadas con el grupo de interés mostraron incongruencias en el acomodo en clados definidos originado principalmente por el bajo número de secuencias incluidas en el análisis debido a que se eligieron sólo como representantes del orden Siluriformes.

Los árboles construidos con los criterios de NJ, MP (Longitud = 24,926 pasos, c.i. = 0.379, r.i. = 0.449) y ML (Longitud = 125,510.29, modelo de evolución GTR+G+I) utilizando mil remuestreos de bootstrap para los tres criterios mostraron a los haplotipos geográficos de *I. pricei* en un solo clado de identidad específica y unidos a su congénere *Ictalurus* representante del clado *punctatus* (Lundberg, 1992, Sullivan *et al.* 2006; Varela-Romero, 2007). Invariablemente, el análisis de bootstrap en cada criterio fue consistente y dio soporte a la monofilia de la familia Ictaluridae con un valor de sostenimiento de 100% al igual que reportado por Sullivan *et al.* (2006), colocando a todos los *Ictalurus* del análisis en un mismo clado (Figuras 7, 8 y 9).

Se observó una relación muy cercana de este clado con su bague hermano *Cranoglanis boudierius* de la familia Cranoglanididae. Este resultado difiere del obtenido por Wang *et al.* (2011) donde la familia hermana de Ictaluridae fue Pangasidae y también difiere de lo encontrado por Peng *et al.* (2006) donde el clado de *P. gigas* y

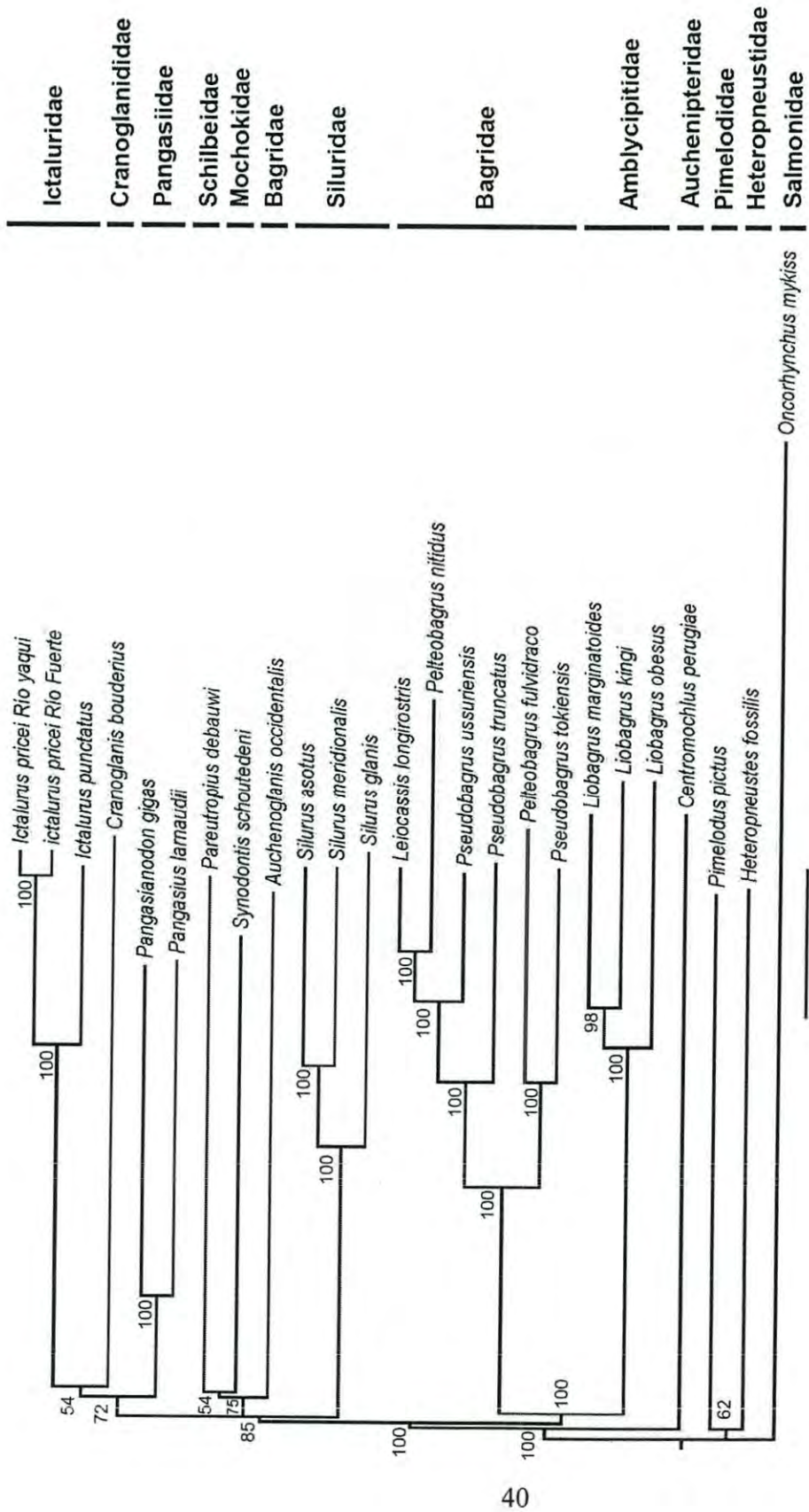
*C. bouderius* se agrupa a *I. punctatus* como representante de la familia Ictaluridae. Según Peng *et al.* (2006) su resultado podría estar influido por un muestreo parcial de taxa en su análisis. En estudios de solo genes y no genomas para inferir las relaciones entre estos grupos, Diogo (2005), Hardman (2005), Peng *et al.* (2005), Sullivan *et al.* (2006), Varela-Romero (2007) y Vega-Heredia (2007), a partir de caracteres morfológicos y moleculares (*CYTB*, *RC*, *ND2*) muestran a los cranoglanídeos como la familia hermana de Ictaluridae. Nuestro análisis mostró a *C. bouderius* agrupado con el clado de la familia Ictaluridae y ambos muy relacionados con su grupo hermano de la familia Pangasiidae integrada por *Pangasianodon gigas* y *Pangasius larnaudii* (Figuras 7, 8 y 9). Estos últimos clados mostraron cercanía con los clados conformados por las familias Mochokidae (*Synodontis schoutedeni*), Bagridae (*Auchenoglanis occidentalis*) y Schilbeidae (*Pareutropius debauwi*) respectivamente (Figuras 7, 8 y 9).

Los bagres de las familia Amblycipitidae (*Liobagrus marginatoides*, *L. kingi* y *L. obesus*) y Bagridae (*Pelteobagrus fulvidraco* y *Pseudobagrus tokiensis*) forman un solo clado con altos valores de bootstrap (100%) unidos con el clado que forman los ictalúridos y su familia hermana (Figuras 7, 8 y 9). La topología para los tres criterios de análisis fue la misma y el bootstrap sólo varió de 91 a 98% en el nodo del clado que forman las especies *Liobagrus marginatoides* y *L. kingi* al interior de la familia Amblycipitidae. Estas familias han sido reportadas cercanas a los clados definidos en los trabajos de Peng *et al.* (2006) y Wang *et al.* (2011). Al interior de la familia Bagridae, las especies de los géneros *Pseudobagrus* y *Pelteobagrus* se muestran anidando en clados distintos a la vez en los tres análisis de este estudio, lo que aparenta un origen polifilético en alguna de estas dos especies de la familia (Figuras 6, 7 y 8). Kartavtsev *et al.* (2007) en su estudio del genoma mitocondrial completo del bagre toro (*Liobagrus obesus*) encuentra que *Pseudobagrus truncatus* está más relacionado con *Leiocassis longirostris* que con otras especies de *Pseudobagrus* utilizadas en su análisis, por lo que concluye que al menos éste género es polifilético y que la sistemática y filogenia de la familia Bagridae no se encuentra debidamente resuelta.

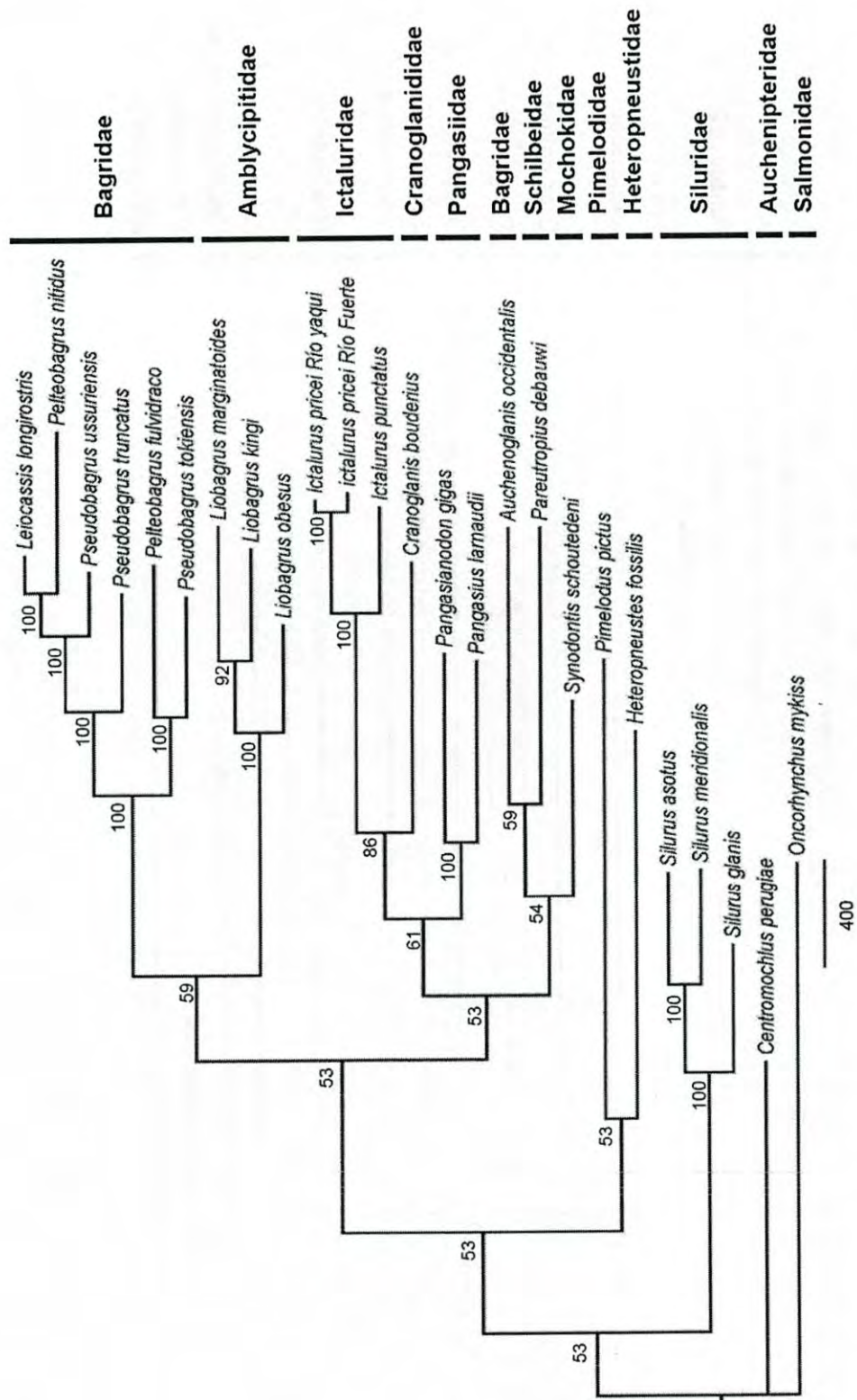
La filogenia molecular del genoma mitocondrial completo de dos haplotipos geográficos del bagre Yaqui, *I. pricei*, se muestra como la única hipótesis de trabajo para desarrollar estudios sobre la biogeografía, especiación y evolución del clado

*punctatus*, de las relaciones filogenéticas con otros *Ictalurus* hermanos de la vertiente Pacífico de la Sierra Madre Occidental y la familia Ictaluridae en Norte América. El número limitado de genomas mitocondriales completos de otros representantes de las especies del género *Ictalurus*, limita el aplicar esta herramienta de análisis, a pesar de que recientemente se ha mencionado a nuestro país como el centro de especiación del género (Miller *et al.* 2005). Adicionalmente, existen varias formas no descritas pertenecientes al género que han sido mencionadas por Miller *et al.* (2005) para los ríos Tunal y Mezquital en la Cuenca del Río Grande de Santiago en Jalisco, en el Río Armería en la propia Cuenca del Río Armería en Colima y en las cabeceras de la Cuenca del Río Pánuco en Hidalgo y Veracruz, además Varela-Romero *et al.* (2011) menciona la existencia de una forma no descrita para las cuencas de los ríos Culiacán y San Lorenzo en Sinaloa y Durango.

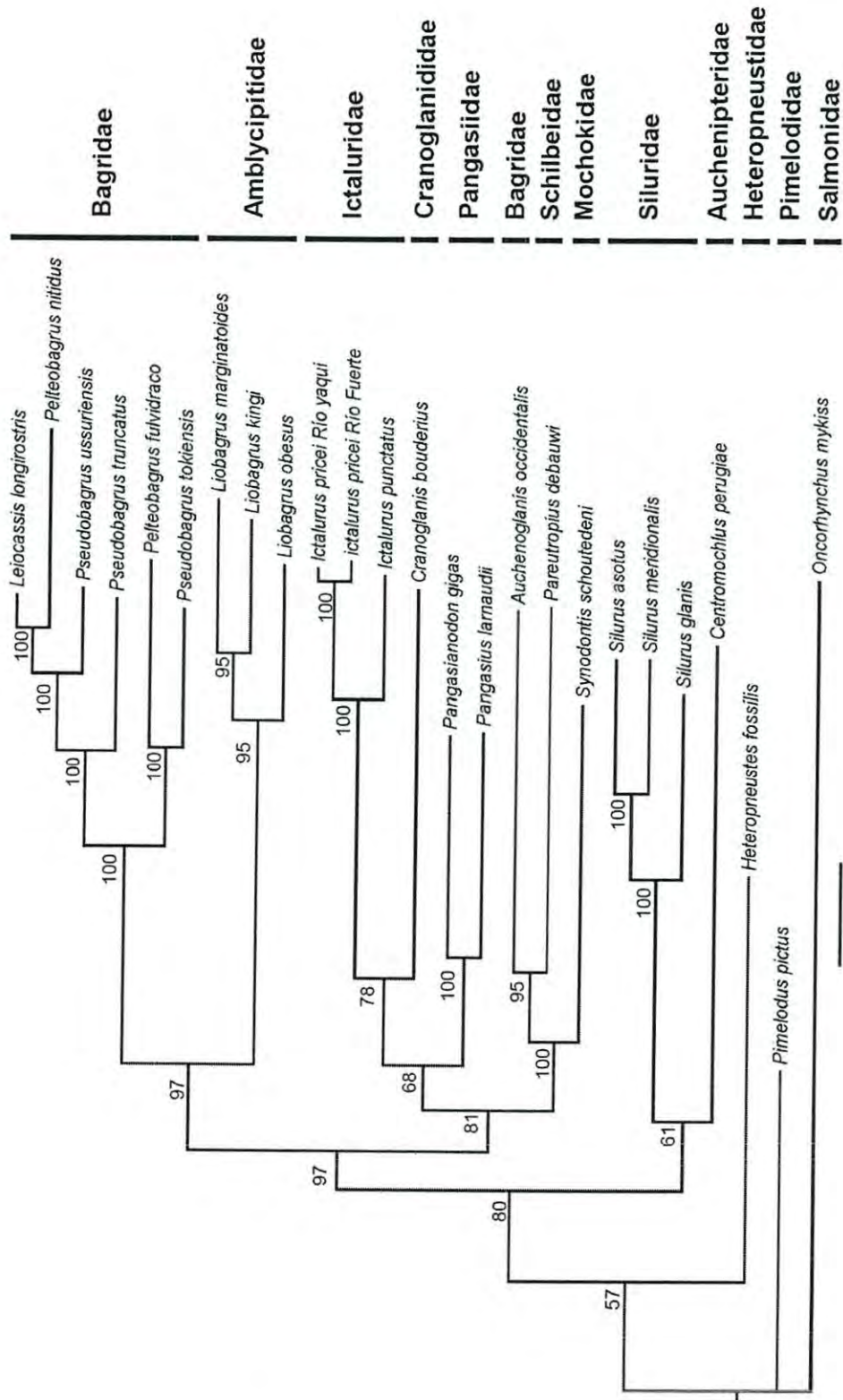
De esta forma, se requieren desarrollar más estudios de genomas mitocondriales completos de otros integrantes de la familia con el propósito de complementar así el conocimiento de su filogenia, el origen de sus especies y de la biogeografía de estas en el Noroeste de México. De igual manera, el uso de genes nucleares podría servir de apoyo en la obtención de un conocimiento más amplio sobre la evolución y filogenia de las especies de peces en nuestro país. El uso de haplotipos de diferentes poblaciones puede ser útil para encontrar marcadores genéticos que puedan coadyuvar en estudios sobre especies del género *Ictalurus* contribuyendo a su uso apropiado y conservación. Adicionalmente, debido a que la información genética de *I. pricei* es muy escasa, con un número limitado de secuencias actualmente disponibles en GenBank, el conocimiento de este genoma mitocondrial puede ser de gran ayuda como base en la obtención de información para estudios posteriores.



**Figura 7.-** Árbol de Neighbor Joining para distancias genéticas bajo el criterio de Kimura 2 parámetros para las especies analizadas. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap obtenidos.



**Figura 8.** - Árbol filogenético obtenido bajo el criterio de máxima parsimonia (MP) para 25 genomas mitocondriales completos con *O. mykiss* como grupo externo. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap obtenidos.



**Figura 9.-** Árbol filogenético obtenido bajo el criterio de máxima verosimilitud (ML) para 25 genomas mitocondriales completos con *O. mykiss* como grupo externo. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap obtenidos.

## VII. CONCLUSIONES

La secuencia nucleotídica completa del ADNmt se obtuvo para dos haplotipos geográficos de bagre Yaqui, *I. pricei*, uno perteneciente a la Cuenca del Río Yaqui y otro a la Cuenca del Río Fuerte. Ambos genomas presentaron una longitud de 16,503 pb con contenidos de A+T de 55.48 y 55.51% respectivamente. La longitud del genoma fue distinta para el resto de los Siluriformes incluyendo a *I. punctatus*.

El genoma mitocondrial de ambos haplotipos geográficos de *I. pricei* presentó el mismo arreglo de genes encontrado en la mayoría de los vertebrados y en los Siluriformes, está compuesto por una región control, 13 genes codificadores para proteínas, dos ARNr's y 22 ARNt's. Las longitudes de los genes en ambos haplotipos fueron las mismas y el gen *ATP8* resultó idéntico en los dos genomas de *I. pricei*.

Los mismos codones de inicio y terminación se detectaron para los genes codificadores de proteínas en ambos genomas mitocondriales de *I. pricei*, siendo los mismos para su congénico más cercano *I. punctatus* sugiriendo ser conservados dentro del género *Ictalurus*, pero distinto con respecto a la mayoría de los genes codificadores de los demás Siluriformes analizados.

La estructura secundaria de los ARNt's se determinó para ambos haplotipos de *I. pricei*. La secuencia nucleotídica y la estructura secundaria de estas moléculas resultaron distintas para los ARNt's de Cisteína y Treonina entre los dos haplotipos geográficos de *I. pricei*. Seis de los ARNt's de *I. pricei* resultaron idénticos a los de *I. punctatus* y el resto fueron diferentes.

Las unidades ribosomales *12S* y *16S* mostraron la misma longitud entre los dos haplotipos de *I. pricei* analizados y fueron muy similares comparadas con *I. punctatus*, pero más variables en comparación con los Siluriformes analizados.

La región control se identificó con 888 pb dividida en tres dominios para los dos haplotipos geográficos de *I. pricei* analizados. El dominio derecho presenta los bloques de secuencias conservadas (CSB) y la caja TATA, en los dominios izquierdo y central se encuentran las secuencias palindrómicas TAS y el dominio central mostró ser muy conservado entre los ictalúridos.

La secuencia putativa que da origen a la replicación de la cadena ligera del genoma mitocondrial se detectó para los dos haplotipos de *I. pricei* analizados y se evidenció una transición para estas secuencias entre los dos haplotipos de *I. pricei*.

En el análisis filogenético realizado las topologías y los soportes de nodos obtenidos para el árbol en cada criterio fueron muy similares para nuestro grupo de interés rectificando la monofilia de la familia Ictaluridae, colocando este clado con su bagre hermano *Cranoglanis boudierius* de la familia Cranoglanididae reportado en estudios anteriores y además se detectó la cercanía de la familia Pangasidae con el clado Ictaluridae + Cranoglanididae.

Adicionalmente a partir del análisis filogenético se logró percatar la falta de estudios para resolver la taxonomía de la familia Bagridae.



## VIII. RECOMENDACIONES

Los esfuerzos para inventariar la fauna de peces dulceacuícolas en todo el Noroeste de México se deben incrementar y renovar para documentar la distribución de ictalúridos y evaluar con precisión el estado de conservación de la biodiversidad de peces nativos del Noroeste de México.

Los estudios moleculares y la secuenciación de genomas mitocondriales y nucleares completos se deben expandir para más especies de ictalúridos nativos de México.

Se recomienda utilizar la información obtenida en este análisis para encontrar marcadores genéticos relacionados a parámetros específicos y biogeográficos que puedan ayudar a otros estudios de especies del género *Ictalurus* para contribuir a su uso apropiado y conservación.

Incrementar el uso de genes específicos como marcadores moleculares para conocer la identidad específica de bagres nativos de México, así como para conocer la variabilidad genética y estructura de sus poblaciones.

Reducir el uso de bagres no nativos en la acuicultura extensiva y la pesca comercial en presas en el Noroeste de México e implementar el uso de especies nativas como *I. pricei*, como una estrategia en la recuperación de especies en peligro de extinción.

Reintroducir a *I. pricei* en su área de distribución natural en la subcuenca del Río Bavispe de donde ha sido extirpada de México, a partir de las poblaciones en cautiverio persistentes en el sur de Arizona.

Conservar la amplia diversidad genética natural de bagres nativos del Noroeste de México, ya que esta posee un valor comercial a largo plazo que puede contribuir a la industria global.

## IX. LITERATURA CITADA

- AGFD. 1992. Threatened native wildlife in Arizona. Arizona Game and Fish Department, Phoenix, Arizona.
- Altschul, F., G. Gish, W. Miller, E.W. Myers y D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Alvarez-Jurado, G. 1987. Genética y acuicultura. p. 1-31. En: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds.), *Genética en Acuicultura*. Industrias Gráficas Españolas. S. L. Madrid.
- Arnason, E. y D.M. Rand. 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics*, 132. 211-220.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers natural history and evolution*. Chapman-Hall. New York, USA. 511 p.
- Beardmore, J.A. G.C. Mair y R.I. Lewis. 1997. Biodiversity in aquatisystem in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, 28: 829-839.
- Bielawski, J.P., y J.R. Gold. 2002. Mutation patterns of mitochondrial H and L strand DNA in closely related cyprinid fishes. *Genetics*, 161: 1589-1597.
- Billington, N. 2003. Mitochondrial DNA. p. 59-100. En: E.M. Hallerman (ed.), *Population genetics: principles and applications for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- Bojorquez, L., Y. Aguirre, y A. Ortega. 1985. Río Yaqui Watershed, Northwestern México: Use and management. p. 475-478. En: R. R. Johnson, C. D. Ziebell, P.F. Patton, P.F. Folliott, y R.E. Hamre (eds.), *Riparian ecosystems and their management: reconciling conflicting issues*. USDA Forest Service General Technical Report RM-12., USDA Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Fort Collins, CO.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Resources*, 27; 1767-1780.
- Boore, J.L., J.R. Macey y M. Medina. 2005. The genomes: Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Methods in Enzimology*, 395: 311-348.
- Brown, J.R., A.T. Beckmebach y M.J. Smith. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution*, 10: 326-341.

- Burgess, W.E. 1989. An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. 784 p.
- Campoy-Favela, J.A., A. Varela-Romero y L. Juárez-Romero. 1989. Observaciones sobre la ictiofauna nativa de la Cuenca del Río Yaqui, Sonora, México. *Ecológica* 1: 1-29.
- Costa, F. y G. Carvalho. 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy*, 3: 29-40.
- Cramer, C.A., A.M.R. Liedke, S.L. Bonatto y R.E. Reis. 2007. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Bulletin of Fish Biology*, 9: 51-59.
- Deacon, J.E., G. Kobetich, J.D. Williams y Contreras-Balderas. 1979. Fishes of North America endangered, threatened, or of special concern: 1979. *Fisheries*, 4: 29-44.
- Demandt, M.H. 2012. Sequence variation in mitochondrial ATP synthase subunit 6 & 8 and nuclear genes ITS1 and ITS2 in 17 cyprinid species. *Journal of Applied Ichthyology*, 9: 278-280.
- Diogo, R. 2005. Adaptations, homoplasies, constraints, and evolutionary trends: catfish morphology, phylogeny and evolution, a case study on theoretical phylogeny and macroevolution. Science Publishers Inc., Enfield.
- Elías-Gutiérrez, M. y M.E. Valdez-Moreno. 2008. El ADN mitocondrial, una opción más para estudiar la biodiversidad. 2008. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 34: 60-67.
- Faber, J.E. y C.A. Stepien. 1998. Tandemly repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the pike-perches *Stizostedion*. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 10: 310-324.
- Faith, J.J. y D.D. Pollock. 2003. Likelihood analysis of asymmetrical mutation bias gradients in vertebrate mitochondrial genomes. *Genetics*, 165: 735-745.
- FAO, 2006-2009. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - México. National Aquaculture Sector.
- Ferguson, M. 1994. The role of molecular genetic marker in the management of cultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 272-299.
- Garesse, R. y C.G. Vallejo. 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, 263: 1-16.

- Hardman, M. 2002. The phylogenetic relationships among extant catfishes, with special reference to Ictaluridae (Otophysi: Siluriformes). Ph. Dissertation. University of Illinois at Urbana-Champaign. Illinois. USA. 206 p.
- Hardman, M. 2004. The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombination activating gene 2. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 30: 395-408.
- Hardman, M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetic Evolution*, 37: 700-720.
- Hardman, M. y L.M. Page. 2003. Phylogenetic Relationships among Bullhead Catfish on the Genus *Ameiurus* (Siluriformes: Ictaluridae). *Copeia*, 1: 20-33.
- He, L., B. Dai, B. Zeng, X. Zhang, B. Chen, B. Yue, y J. Li. 2009. The complete mitochondrial genome of the Sichuan Hill Partridge (*Arborophila rufipectus*) and a phylogenetic analysis with related species. *Gene*, 435: 23-28.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, y J. R. De Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 313-321.
- Hendrickson, D.A. 1984. Distribution records of native and exotic fishes in the Pacific drainages of northern México. *Journal of Arizona–Nevada Academy of Science*, 18: 33-38.
- Hendrickson, D.A. y A. Varela-Romero. 2002. Fishes of the Río Fuerte Drainage. p. 172-195. En: M. L. Lozano-Vilano (ed.), *Libro Jubilar en Honor al Dr. Salvador Contreras Balderas*, UANL. Monterrey, N. L., México.
- Hubert, N, R. Hanner, E. Holm, N. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April y L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PloS ONE*, 3: 1-8.
- Jolly, C., C. Ligeon, J. Crews, Z. Morley y D.R. Dunham. 2001. Present and future trends in the U.S. catfish industry: strategies and concerns for millennium years. *Reviews in Fisheries Science*, 9: 271–295.
- Jondeung, A., P. Sangthong y R. Zardoya. 2007. The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene*, 387: 49–57.
- Kartavtsev, Y.P. y J.S. Lee. 2006. Analysis of nucleotide diversity at genes *cyt b* and *COI* on population, species, and genera levels: applicability of DNA and allozyme data in genetics of speciation. *Russian Journal of Genetics*, 42: 341–362.

- Kartavtsev, Y.P., S.O. Jung y Y.M. Lee. 2007 Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): genome description and phylogenetic considerations inferred from the *cyt b* and *16S* rRNA genes. *Gene*, 396: 13–27.
- Kim, I.C., H.S. Kweon, J.K. Young, C.B. Kim, M.C. Gye, W.O. Lee, Y.S. Lee y J.S. Lee. 2004a. The complete mitochondrial genome of the javeline goby *Acanthogobius hasta* (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic considerations. *Gene*, 336: 147–153.
- Kim, Y.J., H.S. Kweon, I.C. Kim, Y.M. Lee, J.M. Kim y J.S. Lee. 2004b. The complete mitochondrial genome of the floating goby, *Gymnogobius petschiliensis* (Perciformes, Gobiidae). *Molecules and Cells*, 17: 446–453.
- Kim, I.C., S.O. Jung, Y.M., Lee, C.J., Lee, J.K., Park y J.S. Lee. 2005. The complete mitochondrial genome of the ray fish *Raja porosa* (Chondrichthyes, Rajidae). *DNA Sequence*, 16: 187–194.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, F.X. Villablanca y A.C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals—amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 6196-6200.
- Kocher, T.D. y C.A. Stepien. 1997. *Molecular systematics of Fishes*. Academic Press. San Diego. Ca. USA. 314 p.
- Kogelnik, A.M., M.T. Lott, M.D. Brown, S.B. Navathe y D.C. Wallace. 1998. MITOMAP: a human mitochondrial genome database. *Nucleic Acids Research*, 26: 112-115.
- Kumazawa, Y., H. Ota, M. Nishida y T. Ozawa. 1998. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*, 150: 313-329.
- Lara, A, J.L. Ponce de León, R. Rodríguez, D. Casane, G. Côté, L. Bernatchez, y E. García-Machado. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, 10: 421–430.
- Lee, W.J., J. Conroy, W.H. Howell y T.D. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 54-66.
- Lee, W. y T.D. Kocher. 1995. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. *Genetics*, 139: 873-887.

F160195

- Li, W.H., 1997. Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic blue fin tuna *Thunnus thynnus*. *Fish Science*, 70: 68–73.
- Lin, Y.H., P.A. McLenachan, A.R. Gore, M.J. Phillips, R. Ota, M.D. Hendy y D. Penny. 2002. Four New Mitochondrial Genomes and the Increased Stability of Evolutionary Trees of Mammals from Improved Taxon Sampling. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2060-2070.
- Lowe, T.M., y S.R. Eddy. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 25: 955–964.
- Lundberg, J.G. 1970. The evolutionary history of North American catfishes, family Ictaluridae. Unpubl. Ph.D. Dissert, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan.
- Lundberg, J.G. 1992. The phylogeny of ictalurid catfishes: a synthesis of recent work. p. 392-420. En: R.L. Mayden (ed.), *Systematics, Historical Ecology and North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press. Stanford. California.
- Lydeard, C. y K.J. Roe. 1997. The phylogenetic utility of the mitochondrial Cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. En: T.D. Kocher, C.A. Stepien (eds) *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press. San Diego. California. USA.
- Mayden, R.L., B.M. Burr, L.M. Page y R.R. Miller. 1992. The native freshwater fishes of North America. p. 827-863. En: Mayden R. L. (ed.), *Systematics, Historical Ecology and North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press. Stanford, California.
- Miller, R.R. 1959. Origins and affinities of the fresh water fish fauna of western North America, p. 187-222. En: C. L. Hubbs (ed.), *Zoogeography*. American Association for the Advancement of Science publications. Washington, D. C.
- Miller, R.R. 1986. Composition and derivation of the freshwater fish fauna of México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. IPN, México 30: 121-153.
- Miller, R.R., W.L. Minckley y S. Norris. 2005. *Freshwater fishes of Mexico*. University of Chicago Press. Chicago. Illinois. 490 p.
- Minckley, W.L. 1973. *Fishes of Arizona*. Arizona. Arizona Game and Fish Department. Phoenix, Arizona. 293 p.
- Minckley, W.L., D.A. Hendrickson y C.E. Bond. 1986. Geography of western North American freshwater fishes: Description and relations to intracontinental tectonism. p. 519-614. En: C. H. Hocutt y E. O. Wiley (eds.), *Zoogeography of freshwater fishes of North America*. Wiley Interscience, New York.
- Minckley, W.L. y P.C. Marsh. 2009. *Inland fishes of the great Southwest: chronicle of a vanishing biota*. University of Arizona Press, Tucson. 426 p.

- Miya, M., y M. Nishida. 1999. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Marine Biotechnology*, 1: 416- 426.
- Mo, T. 1991. Anatomy, relationships and systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) with a hypothesis of siluroid phylogeny. *Theses Zoologicae* 17. Koeltz Scientific Books. Koenigstein. 216 p.
- Nagase, M., T. Aimi, K. Suginaka, Y. Kitamoto y T. Morinaga. 2005. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese flying fish *Cypselurus hiraii*. *Fish Science*, 71: 914–923.
- Nakatani, M., M. Miya, K. Mabuchi, K. Saitoh y M. Nishida. 2011. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. *Evolutionary Biology*, 11: 177.
- NatureServe. 2013. *Ictalurus pricei*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 01 August 2013.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York USA. 512 p.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the World*. John Wiley and Sons, New York, 600 p.
- Nohara, M., M. Nishida, M. Miya y T. Nishikawa. 2005. Evolution of the mitochondrial genome in cephalochordata as inferred from complete nucleotide sequences from two epigonichthys species. *Journal of Molecular Evolution*, 60: 526–537.
- Ojala, D., J. Montoya y G. Attardi,. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290: 470–474.
- Orti, G., P. Petry, J.I.R. Porto, M. Jegu y A. Meyer. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42: 169–182.
- Parker, A. y I. Kornfield. 1995. Molecular perspective on evolution and zoogeography of Cyprinodontid Killifishes (Teleostei: Atherinomorpha). *Copeia*, 1995: 8–21.
- Peng, Z, Y.Q. Chen, Y.F. Liu, H. Zhou, L.H. Qu. 2003. The complete mitochondrial genome of the chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata). *Gene*, 311: 93–98.
- Peng, Z., Y. Zhang, S. He y Y. Chen. 2005. Phylogeny of chinese catfishes inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. *Acta Genetica Sinica*, 32: 145–154.



- Peng, Z., J. Wang y S. He. 2006. The complete mitochondrial genome of the helmet catfish *Cranoglanis boudierius* (Siluriformes: Cranoglanididae) and the phylogeny of otophysan fishes. *Gene*, 376: 290-297.
- Philippe, H., D. Frédéric, H. Brinkmann y N. Lartillot. 2005. Phylogenomics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 36: 541-62.
- Posada, D. y K.A. Crandall. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1: 817-818.
- Posada, D. y T.R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53: 793-808.
- Prosdocimi, F., D. Cardoso-de Carvalho, R. Nascimento-de Almeida y L.B. Beheregaray. 2011. The complete mitochondrial genome of two recently derived species of the fish genus *Nannoperca* (Perciformes, Percichthyidae). *Molecular Biology Reports*, 39: 2767-2772.
- Rand, D.M. 2001. The Units of Selection on Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 415- 448.
- Randi, E. 2000. Mitochondrial DNA. 136-167 p. En: A. Baker (ed.), *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Malden.
- Reyes, A., C. Gissi, G. Pesole y C. Saccone. 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 957-966.
- Rock, J, F.O. Costa, D.I. Walker, A.W. North, W.F. Hutchinson y G.R. Carvalho. 2008. DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. *Antarctic Science*, 20: 253-262.
- Rodiles-Hernández, R., D.A. Hendrickson, J.G. Lundberg y J.M. Humphries. 2005. *Lacantunia enigmatica* (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically puzzling freshwater fish from Mesoamerica. *Zootaxa*, 1000: 1-24.
- Rokas, A., E. Ladoukakis y E. Zorros. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 411-417.
- Rutter, C.M. 1896. Notes on fresh water fishes of the Pacific slope of North America. II. The fishes of Rio Yaqui, Sonora, with the description of a new genus of Siluridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 6: 255-262.
- Saccone, C., M. Attimonelli y E. Sbisà. 1987. Structural Elements Highly Preserved During the Evolution of the D-loop Containing Region Vertebrate Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 26: 205-211.

- Saccone, C., G. Pesole y E. Sbisa. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33: 83-91.
- Saitoh, K., M. Miya y J.G. Inoue. 2003. Mitochondrial genomics of Ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. *Journal of Molecular Evolution*, 56: 464-472.
- Sbisa, E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole y C. Saccone. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205: 125-140.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, Diario Oficial de la Federación (Segunda Sección):1-81.
- SEMARNAT. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación (Segunda Sección):1-78.
- Shadel, G.S. y D.A. Clayton. 1993. Mitochondrial Transcription initiation. *Biological Chemistry*, 268: 16083-16086.
- Shadel, G.S. y D.A. Clayton. 1997. Mitochondrial DNA Maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry*, 66: 409-435.
- Shi, W., X.Y. Kong, Z.M. Wang y J.X. Jiang. 2011. Utility of tRNA Genes from the Complete Mitochondrial Genome of *Psetta maxima* for Implying a Possible Sister-group Relationship to the Pleuronectiformes. *Zoological Studies*, 50: 665-681.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu y P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651 -701.
- Smith, M.L. y R.R. Miller. 1986. The evolution of the Rio Grande basin as inferred from the fish fauna. p. 459-485. En: C. H. Hocutt y E. O. Wiley (eds.), *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y.
- Stepien, C.A., M.T. Dixon y D.M. Hillis, 1993. Evolutionary relationships of the blennioid fish families Clinidae, Labrisomidae and Chaenopsidae: congruence between DNA sequence and allozyme data. *Bulletin of Marine Science*, 52: 496-515.

- Stepien, C.A., A.K. Dillon, M.L. Brooks, K.L. Chase y A.N. Hubers. 1997. The evolution of blennioid fishes based on an analysis of mitochondrial 12S rDNA sequence data. p. 245-270. En: T.D. Kocher, y C.A. Stepien (eds.), Molecular Systematics of Fishes. Academic Press, San Diego.
- Sturmbauer, C. y A. Meyer. 1992. Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. *Nature*, 358: 578-581.
- Sullivan, J.P., J.G. Lundberg y M. Hardman. 2006. A phylogenetic analysis of the mayor groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) Using *rag1* and *rag2* nuclear sequences genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 636-662.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP\* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- Taanman, J.M. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 103-123.
- Tanaka, M. y T. Ozawa. 1994. Strand asymmetry in human mitochondrial mutations. *Genomics*, 22: 327-335.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- USFWS. 1984. Endangered and threatened wildlife and plants; final rule to determine the Yaqui chub to be an endangered species with critical habitat, and to determine the beautiful shiner and Yaqui catfish to be threatened species with critical habitat. *Federal Register*, 49: 34490-34497.
- Varela-Romero, A. 1995. Perspectivas de recuperación y cultivo de peces nativos en el Noroeste de México. Publicaciones Académicas. CICTUS, Serie CM 3: 1-6.
- Varela-Romero, A. 2007. Variación genética mitocondrial en bagres del género *Ictalurus* (Pisces: Ictaluridae) en el Noroeste de México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. 194 p.
- Varela-Romero, A. y D.A. Hendrickson. 2009. Peces dulceacuícolas. p 339-356 En: F.E. Molina-Fraener y T.R. Van Devender (eds.), Diversidad biológica de Sonora. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Varela-Romero, A., G. Yepiz-Plascencia, D.A. Hendrickson, J.E. Brooks y D. A. Nelly. 2011. Status of the Yaqui catfish (*Ictalurus pricei*) in the United States and northwest Mexico. *Southwestern Naturalists*, 56(2): 278-286.

- Vega-Heredia, S. 2007. Caracterización y filogenia de la región control del genoma mitocondrial de especies del género *Ictalurus* (Pisces: Ictaluridae) en el Noroeste de México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. 57 p.
- Walberg, M.W. y D.A. Clayton. 1981. Sequence and properties of the human Kb cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 9: 5411-5421.
- Waldbieser, G.C., A.L. Bilodeau y D.J. Nonneman. 2003. Complete sequence and characterization of the channel catfish mitochondrial genome. *DNA Sequences*, 14: 265-277.
- Wang, X., J. Wang, S. He y R.L. Mayden. 2007. The complete mitochondrial genome of the chinese hook snout carp *Opsariichthys bidens* (Actinopterygii: Cypriniformes) and an alternative pattern of mitogenomic evolution in vertebrate. *Gene*, 399: 11-19.
- Wang, J., T. Shen, J. Ju, G. Yang. 2011. The complete mitochondrial genome of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* (Siluriformes: Bagridae) and a time-calibrated phylogeny of ostariophysan fishes. *Molecular Biology Reports*, 38: 2507-2516.
- Ward, R.D., B.H. Holmes y G.K. Yearsley. 2008a. DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (barramundi) (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Biology*, 72: 458-463.
- Ward, R.D, B.H. Holmes, W.T. White y P.R. Last. 2008b. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine & Freshwater Research*, 59: 57-71.
- Wilcox, T.P, F.J. García de León, D.A. Hendrickson y D.M. Hillis. 2004. Convergence among cave catfishes: long-branch attraction and a Bayesian relative rates test. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 1101-1113.
- Williams, J.E., J.E. Johnson, D.A. Hendrickson, S. Contreras-Balderas, J.D. Williams, M. Navarro-Mendoza, D.E. McAllister y J.E. Deacon. 1989. Fishes of North America: endangered, threatened, or of special concern: 1989. *Fisheries*, 14:2-20.
- Yun, Y.E., J.N. Yu, S. Kim y M. Kwak. 2012. The complete mitochondrial genome of Kungang fat minnow *Rhynchocypris kungangensis* (Cypriniformes, Leuciscinae) in Korea. *Mitochondrial DNA*, 23: 347-349.
- Zwickl, D.J. y D.M. Hillis. 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology*, 51: 588-98.