

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

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS FENOTIPOS
DE LA MEDUSA BOLA DE CAÑÓN (*Stomolophus*
meleagris) EN LA COSTA CENTRAL DE SONORA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA
OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CINTYA ALEJANDRA NEVÁREZ LÓPEZ

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2010

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

A mi madre y amiga por su amor incondicional y su guía en el camino de la ciencia

A mi padre por su cariño y apoyo en todo momento

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por el otorgamiento de beca para la realización de este trabajo de tesis, así como el uso de sus instalaciones, en particular al proyecto Ciencia Básica CONACYT 106787.

A la Universidad de Sonora, por darme una formación en las ciencias biológicas y abrirme las puertas a un mundo de ciencia.

A mi directora de tesis, Dra. Norma Y. Hernández S. por su apoyo, consejo, paciencia y dedicación en todo el proceso de realización de esta tesis.

A mi comité de tesis, Dr. Eduardo Valdez, Biol. Norberto Pasten, Dr. Alejandro Varela, por sus consejos en la elaboración adecuada de esta investigación.

A la Dra. Juana López Martínez, por el apoyo, facilitación y uso de información para la realización de este trabajo.

Al laboratorio especializado de pesquerías CIBNOR-Unidad Guaymas y la técnica M.C. Eloisa Herrera, por las facilidades proporcionadas en la colecta y registro de los organismos.

Al laboratorio de Genética Molecular CIBNOR-Unidad La Paz y la técnica M.C. Delia Rojas, por su paciencia y apoyo en la realización de esta investigación.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular, Oscar, Reyna, Angélica, Norma L., Betty, Jehu, Alejandra por su amistad.

A Delia, Oscar, Reyna, Norma L. por convertirse en mi familia, por apoyarme y darme ánimos para seguir.

Al Dr. Arturo Sánchez y a CIBNOR-Unidad Hermosillo, por las facilidades otorgadas en el uso de equipo y espacio en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de la carrera, por hacer divertidas las horas de escuela.

Azucena, Lety, Edgar, Lastra, gracias por su apoyo y su amistad, la carrera no hubiera sido igual sin ustedes.

A Michel, por darme su amistad incondicional y escucharme siempre, gracias amiga.

A mis hermanos Andrea y Manuelito, por escucharme y apoyarme incondicionalmente, además de alegrar mi vida en cada momento.

A mi mejor amigo y amor, Manuel A. Lastra, por estar a mi lado y formar parte de mi vida, por escucharme, apoyarme, levantarme y darme fuerzas para seguir.

A todas las personas, que aunque no mencione, me ayudaron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ii |
| RESUMEN..... | v |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 3 |
| II.1. Las medusas (Clase Scyphozoa)..... | 3 |
| II.1.1. Generalidades..... | 3 |
| II.1.2. Clasificación taxonómica..... | 6 |
| II.2. <i>Stomolophus meleagris</i> | 6 |
| II.2.1. Ciclo de vida..... | 8 |
| II.2.2. Distribución y abundancia..... | 10 |
| II.2.3. Pesquería y usos..... | 13 |
| II.3. Análisis genéticos..... | 17 |
| III. HIPÓTESIS..... | 18 |
| IV. OBJETIVOS..... | 18 |
| IV.1. Objetivo general..... | 18 |
| IV.2. Objetivos particulares..... | 18 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 19 |
| V.1. Colecta de organismos..... | 19 |
| V.2. Extracción y purificación de ADN total..... | 20 |
| V.3. Cuantificación y verificación de la integridad del ADN..... | 21 |
| V.4. Amplificación parcial de genes..... | 21 |
| V.5. Purificación y secuenciación de amplicones..... | 23 |
| V.6. Análisis de secuencias..... | 24 |
| V.7. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)..... | 25 |
| V.8. Análisis de correlación..... | 26 |
| VI. RESULTADOS..... | 27 |
| VI.1. Colecta de organismos..... | 27 |
| VI.2. Extracción, amplificación, purificación y secuenciación de genes..... | 31 |
| VI.3. Análisis de secuencia de los genes COI y 12S..... | 38 |
| VI.4. Diversidad genética y estructura genética..... | 48 |
| VI.5. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)..... | 55 |
| VI.6. Análisis de correlación..... | 59 |
| VII. DISCUSIÓN..... | 61 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 67 |
| IX. LITERATURA CITADA..... | 68 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla I. Capturas de <i>S. meleagris</i> en algunos puntos de pesca del estado de Sonora (México) durante el 2006 (modificado de Álvarez-Tello, 2007)..... | 16 |
| Tabla II. Lista de protocolos de extracción de ADN ensayados..... | 20 |
| Tabla III. Relación de cebadores usados para amplificación de fragmentos de genes específicos..... | 22 |
| Tabla IV. Programas utilizados para amplificación específica de diversos fragmentos de genes mitocondriales de <i>S. meleagris</i> | 23 |
| Tabla V. Listado de enzimas de restricción utilizadas en el presente estudio..... | 25 |
| Tabla VI. Relación de organismos muestreados, por localidad y fenotipo (blanco, azul y morado)..... | 27 |
| Tabla VII. Características generales de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados de los genes COI y 12S de <i>S. meleagris</i> | 38 |
| Tabla VIII. Análisis de alineamiento de secuencias de nucleótidos con bases de datos mundiales (NCBI, Blastn)..... | 40 |
| Tabla IX. Análisis general de secuencias de los genes COI y 12S de <i>S. meleagris</i> | 49 |
| Tabla X. Distribución de frecuencias haplotípicas encontradas en el gen COI de <i>S. meleagris</i> (nota: entre paréntesis se presentan las frecuencias absoluta y relativa de cada haplotipo)..... | 50 |
| Tabla XI. Distribución de frecuencias haplotípicas encontradas en el gen 12S de <i>S. meleagris</i> (nota: entre paréntesis se presentan las frecuencias absoluta y relativa de cada haplotipo)..... | 51 |
| Tabla XII. Análisis AMOVA del gen COI de <i>S. meleagris</i> . (*) Prueba de significancia (1,023 permutaciones). V_a y F_{ST} : $P(\text{rand. value} > \text{obs. value}) = 0.0146$. $P(\text{rand. value} = \text{obs. value}) = 0.0000$. $P\text{-value} = 0.0146 \pm 0.0036$ | 53 |
| Tabla XIII. Análisis AMOVA del gen 12S de <i>S. meleagris</i> , (*) Prueba de significancia (1,023 permutaciones). V_a y F_{ST} : $P(\text{rand. value} > \text{obs. value}) = 0.29619$. $P(\text{rand. value} = \text{obs. value}) = 0.00489$. $P\text{-value} = 0.30108 \pm 0.0099$ | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representación esquemática de la fase pólipo (A) y la fase medusa (B) de los cnidarios (tomado de Curtis, 2000)..... | 4 |
| Figura 2. Representación esquemática de la estructura de las medusas (boca, cavidad digestiva o gastrovascular y tentáculos) y los cnidoblastos (tomado de Harley-Miller, 2001)..... | 5 |
| Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la campana de medusas Scyphozoa, donde se señalan diversas estructuras y tipos de tejidos (tomado de Harley-Miller, 2001)..... | 5 |
| Figura 4. Fenotipos blanco y azul de la medusa bola de cañón, <i>S. meleagris</i> , registrados en el estado de Sonora, México (tomado de López y Álvarez, 2008)..... | 7 |
| Figura 5. Ciclo de vida general de <i>S. meleagris</i> (modificado de Calder, 1982)..... | 9 |
| Figura 6. Acumulaciones naturales en forma de franjas y manchas irregulares o “parches” de <i>S. meleagris</i> en Las Guásimas, Son., temporada 2003 (Tomado de López y Álvarez, 2008)..... | 11 |
| Figura 7. Densidad anual de <i>S. meleagris</i> reportada en las costas del Atlántico de los Estados Unidos, durante el periodo 2001-2008 (SEAMAP, 2008)..... | 13 |
| Figura 8. <i>S. meleagris</i> , fenotipo azul, colectada en las Guasimas (Son.), durante Abril-Mayo del 2008..... | 28 |
| Figura 9. <i>S. meleagris</i> fenotipo blanco, colectada en las Guasimas (Son.), durante Abril del 2008..... | 29 |
| Figura 10. <i>S. meleagris</i> , fenotipo morado, en sus diferentes variantes. A) morado intenso sin lunares, B) blanco transparente con tonalidad morado y lunares oscuros grandes, y C) morado transparente con lunares medianos oscuros en la campana. Sitio de Colecta, Bahía Kino, Junio-Agosto del 2009..... | 30 |
| Figura 11. Electroforésis TBE-agarosa al 1% de ADN genómico de los diferentes fenotipos de medusa bola de cañón <i>S. meleagris</i> . M, marcador de peso molecular. Técnica de tinción EtBr..... | 32 |
| Figura 12. Electroforésis en gel de TBE-agarosa al 1% de productos de PCR de prueba usando diversos oligonucleótidos y sus combinaciones..... | 33 |

- Figura 13. Electroforesis en gel de TBE-agarosa al 1% de productos de PCR de los genes: COI (~700 pb) y 12S (~200 pb) para los diferentes fenotipos de *S. meleagris*. M, marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen). Técnica de tinción: EtBr.....34
- Figura 14. Electroferograma de un producto de PCR-COI de *S. meleagris*. Se muestra la secuencia de nucleótidos, teniendo el siguiente código de señal (colores): adenina, verde; guanina, negro; citosina, azul y timidina, rojo.....35
- Figura 15. Análisis de alineamiento de las secuencias de nucleótidos de 635 bases del gen COI de los fenotipos blanco (MB), azul (MA) y morado (MBG) de *S. meleagris*, colectadas en las Guásimas (G) y Bahía Kino (BK), Sonora.....36
- Figura 16. Análisis de alineamiento de las secuencias de nucleótidos de 195 bases del gen 12S ribosomal de los fenotipos blanco (MB), azul (MA) y morado (MBG) de *S. meleagris*, colectada en las Guásimas (G) y Bahía Kino (BK), Sonora.....37
- Figura. 17. Árbol consenso estricto de vecino más cercano (NJ) para gen COI (100 árboles), basado en 682 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. ReEU373724, *Rophilema esculentum*. AaAY903210, *Aurelia aurita*. PsFJ423978, *Porites solida*. PpGU945497, *Phytophthora pseudotsugae*. Stme, *Stomolophus meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.....42
- Figura. 18. Árbol consenso estricto de máxima parsimonia (MP) para gen COI (100 árboles), basado en 682 pb (132 sitios informativos para parsimonia). Longitud= 442; Índice de Consistencia (CI) = 0.855; Índice de Retención (RI)= 0.688; Índice de Consistencia Reescalado (RC)= 0.588. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. ReEU373724, *R. esculentum*. AaAY903210, *A. aurita*. PsFJ423978, *P. solida*. PpGU945497, *Ph. pseudotsugae*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.....43
- Figura. 19. Árbol consenso estricto de máxima verosimilitud (ML) para gen COI (100 árboles), basado en 682 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. ReEU373724, *R. esculentum*. AaAY903210, *A. aurita*. PsFJ423978, *P. solida*. PpGU945497, *Ph. pseudotsugae*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.....44
- Figura. 20. Árbol consenso estricto de vecino más cercano (NJ) para gen 12S (100 árboles), basado en 925 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. AvNC010769, *Aphrocallistes vastus*. HpFJ489415, *Hormathia pectinata*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.....45
- Figura. 21. Árbol consenso estricto de máxima parsimonia (MP) para gen 12S (100 árboles), basado en 925 pb (53 sitios informativos para parsimonia). Longitud= 650;

Índice de Consistencia (CI) = 0.914; Índice de Retención (RI)= 0.559; Índice de Consistencia Reescalado (RC)= 0.511. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. AvNC010769, *Ap. vastus*. HpFJ489415, *H. pectinata*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.....46

Figura 22. Árbol consenso estricto de máxima verosimilitud (ML) para gen 12S (100 árboles), basado en 925 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. AvNC010769, *Ap. vastus*. HpFJ489415, *H. pectinata*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.....47

Figura 23. Análisis electroforético en geles de TBE-agarosa al 2% de perfiles de restricción de amplicones ITS1 (1,339 pb) de los diferentes fenotipos de *S. meleagris*. Líneas: 1, fenotipo azul; 2, fenotipo blanco y 3, fenotipo morado. Técnica de tinción EtBr.....56

Figura 24. Patrones electroforéticos de restricción con *Nde* I de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos y localidades de colecta de *S. meleagris*, resueltos en geles de TBE-poliacrilamida al 15%. Notación: M, fenotipo morado; B, fenotipo blanco; A, fenotipo azul; Y, Yávaros; G, Guásimas, y Bk, Bahía de Kino. Técnica de Tinción: de SYBR Gold (Invitrogen).....57

Figura 25. Patrones electroforéticos de restricción con *Pst* I de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos y localidades de colecta de *S. meleagris*, resueltos en geles de TBE/poliacrilamida 15%. Notación: M, fenotipo morado; B, fenotipo blanco; A, fenotipo azul; Y, Yávaros; G, Guásimas, y Bk, Bahía Kino. Técnica de Tinción: de SYBR Gold (Invitrogen).....58

Figura 26. Patrones electroforéticos de restricción con *Bam* HI de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos y localidades de colecta de *S. meleagris*, resueltos en geles de TBE/poliacrilamida 15%. Notación: M, fenotipo morado; B, fenotipo blanco; A, fenotipo azul; Y, Yávaros; G, Guásimas, y Bk, Bahía Kino; C-, control negativo. Técnica de Tinción: de SYBR Gold (Invitrogen).....58

Figura 27. Representación grafica de la relación entre la presencia de *S. meleagris* fenotipo blanco y azul (en Las Guásimas, Sonora, 2008) y la temperatura (a), productividad primaria (b) y nutrientes (c) a través del tiempo (eje X = meses).....60

RESUMEN

Stomolophus meleagris o medusa bola de cañón se identifica por su color azul, sin embargo en la naturaleza se han encontrado organismos que presentan distintos patrones de coloración aunque a la fecha no existe ningún reporte genético de la especie en relación a estas coloraciones. Mediante un permiso de pesca de fomento, en el estado de Sonora, el CIBNOR inició investigaciones sobre la especie considerándola un recurso con potencial de desarrollo pesquero. Durante las campañas de muestreo se observaron frecuentemente diferentes coloraciones en *S. meleagris*, particularmente en la región de Las Guásimas y Bahía de Kino. Al no contar con reportes genéticos ni taxonómicos de estas variaciones en el color, este trabajo tiene la finalidad de establecer si los fenotipos observados en *S. meleagris* en Las Guásimas y Bahía de Kino, Sonora, corresponden a diferentes o a una misma especie, aportando así al conocimiento de la especie y proporcionando algunos elementos de uso legal en la pesquería. Se realizaron colectas en Abril y Mayo (2008) en la región de Las Guásimas y en Junio (2009) en Bahía de Kino. En cada colecta se registraron los datos de cada organismo así como las variables fisicoquímicas del agua (temperaturas superficiales de agua, salinidad, oxígeno disuelto, clorofilas y nutrientes -fosfatos, nitratos y nitritos-). Se purificó ADN total de tejidos fijados en etanol al 70%; se amplificaron varias regiones del mtDNA (12S y COI) y nDNA (ITS1). Las secuencias obtenidas (COI y 12S) se cotejaron en NCBI mediante Blast, se editaron (DNAMAN) y alinearon (Clustal X) para los análisis de estructura genética (Mega y Arlequin) y las relaciones evolutivas (PAUP). Para determinar correlación entre los parámetros fisicoquímicos y la distribución de los fenotipos, se realizaron análisis de regresión lineal, finalmente, se aplicó la técnica de PCR-RFLP (ITS1) para determinar posible estructura genética, por fenotipo y localidad. Los fenotipos blanco y azul se encontraron en Abril (el fenotipo azul fue más abundante); en Mayo, el fenotipo blanco no se encontró. Un tercer fenotipo morado, se presentó únicamente durante Junio 2009. Se encontró una correlación ($R^2 = 0.87$) entre la presencia de medusas blancas con los registros más bajos de temperatura (23.5°C). El análisis de las secuencias obtenidas para los genes COI y 12S, revelaron que los fenotipos encontrados, en la distribución de la especie (azul, blanco y morado), no presentan diferencias a nivel de especie. El análisis PCR-RFLP del fragmento ITS1, no reveló estructura poblacional, ni por fenotipo ni por localidad, concluyendo que las variantes en pigmentación observadas en la distribución de *S. meleagris* en las costas del estado de Sonora, corresponden a un claro caso de plasticidad fenotípica.

Palabras claves: *Stomolophus*, Sonora, fenotipos.

I. INTRODUCCIÓN

Las medusas forman parte de la base evolutiva de los metazoarios al poseer estructuras primitivas, las cuales nos permiten entender la variación morfológica de especies existentes. Además participan de manera muy importante en las cadenas tróficas, como depredadores voraces, por lo que su aparición en regiones donde no se habían observado con anterioridad y su aumento significativo en abundancia en regiones con registros previos, ha generado una gran incertidumbre sobre la causa de este fenómeno. Aunado a esto, las pérdidas ocasionadas a la industria pesquera por la aparición de estos organismos ha llevado a gobiernos y comunidad científica a generar líneas de investigación para encontrar respuestas y soluciones a los múltiples problemas que se presentan.

A nivel mundial, el desarrollo del conocimiento sobre las medusas se ha enfocado básicamente a aspectos biológicos y, en algunos casos, filogenéticos. La genética en la biología ha fortalecido el conocimiento de las especies y sobre su evolución permitiendo entender de forma más clara el comportamiento de los organismos y su adaptación al ambiente. Se ha observado que las especies presentan diferentes formas y patrones de pigmentación, poniendo en duda la utilización única de los aspectos morfológicos, como base fundamental de su clasificación sistemática y taxonómica, utilizando consecuentemente algunos aspectos genéticos para poder explicar este fenómeno.

En México, las investigaciones sobre este grupo de organismos no consideran aspectos genéticos, sin embargo, se ha observado una diversidad de coloraciones en la distribución natural de *Stomolophus meleagris* o medusa bola de cañón.

En el estado de Sonora ésta especie está considerada como un recurso pesquero potencial, sin embargo, se han observado tres patrones diferentes de coloración, blanca, azul y morada, sin que a la fecha se haya determinado si se trata de la misma o de varias especies.

El presente estudio aborda la problemática mencionada con anterioridad debido a que no existen reportes genéticos sobre *S. meleagris*, donde yace la importancia de este trabajo, complementando los estudios biológicos y pesqueros existentes a la actualidad.

Este estudio aborda primero la información biológica (ciclo de vida, taxonomía, distribución, aprovechamiento), así como un recuento de las investigaciones realizadas sobre *S. meleagris* tanto a nivel mundial como en Sonora. Posteriormente se aborda metodología y resultados, determinando que las coloraciones observadas en la costa central de Sonora corresponden a variaciones en la plasticidad fenotípica de la especie.

II. ANTECEDENTES

Los cnidarios son un filo muy extenso de organismos acuáticos, que incluye hidras, medusas, anémonas de mar y corales; son los organismos más conspicuos y de mayor importancia en los ecosistemas de arrecifes coralinos. Presentan características únicas como una cavidad gastrovascular, sistema nervioso primitivo, son diblásticos por tanto tienen solo dos hojas embrionarias (ectodermo y endodermo) y presentan además organización por niveles de tejidos.

Las clases del filo son Hidrozoa (*Physalis*, *Obelia*, *Hidra*, entre otras), Scyphozoa (*Aurelia* o medusa luna, *Linuche*, entre otras), Cubozoa (*Chironex*, *Chiropsalmun*, *Mastigias*, entre otras) y Anthozoa (anémonas) (Harley-Miller, 2001).

II.1.Las Medusas (Clase Scyphozoa)

II.1.1. Generalidades

Todos los miembros de la clase Scyphozoa son de origen marino, se conocen como medusas verdaderas. Durante su ciclo de vida, las medusas presentan dos estructuras características de los cnidarios: la fase pólipo y la fase medusa (Fig. 1).

La fase pólipo es sésil, se presenta como un tallo cilíndrico cuyo extremo oral se dirige hacia arriba y porta la boca y tentáculos; el extremo opuesto permanece fijo al sustrato (Fig. 1A).

La fase medusa (Fig. 1B y 2) se presenta con el cuerpo en forma de campana, con la parte convexa hacia arriba y la boca cóncava; los tentáculos cuelgan a partir del borde de la campana (Barnes y Ruppert, 1977). Son organismos de vida libre, nadando o flotando (horizontal o verticalmente), los movimientos horizontales se deben principalmente a las corrientes, los verticales son resultado del movimiento propio del organismo (Harley-Miller, 2001). En la mesoglea presentan células merenquimáticas ameboideas (Fig. 3).

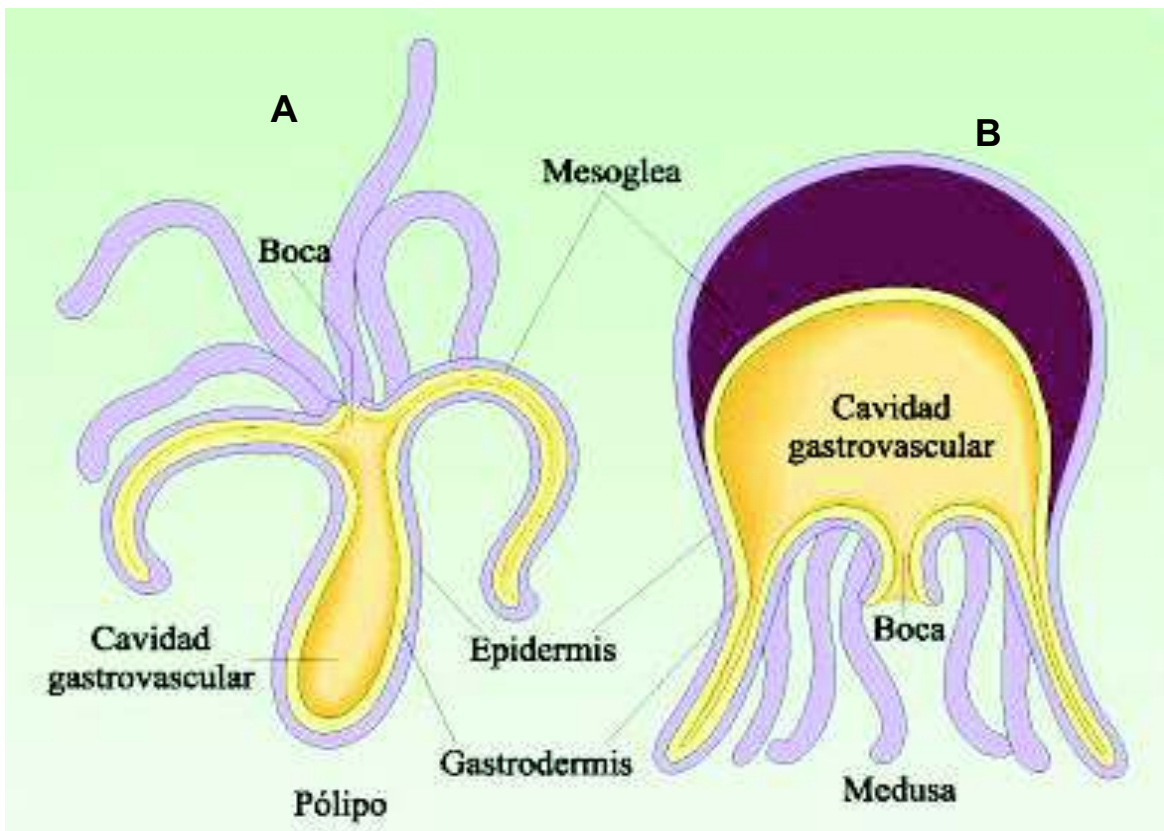


Figura 1. Representación esquemática de la fase pólipo (A) y la fase medusa (B) de los cnidarios (tomado de Curtis, 2000).

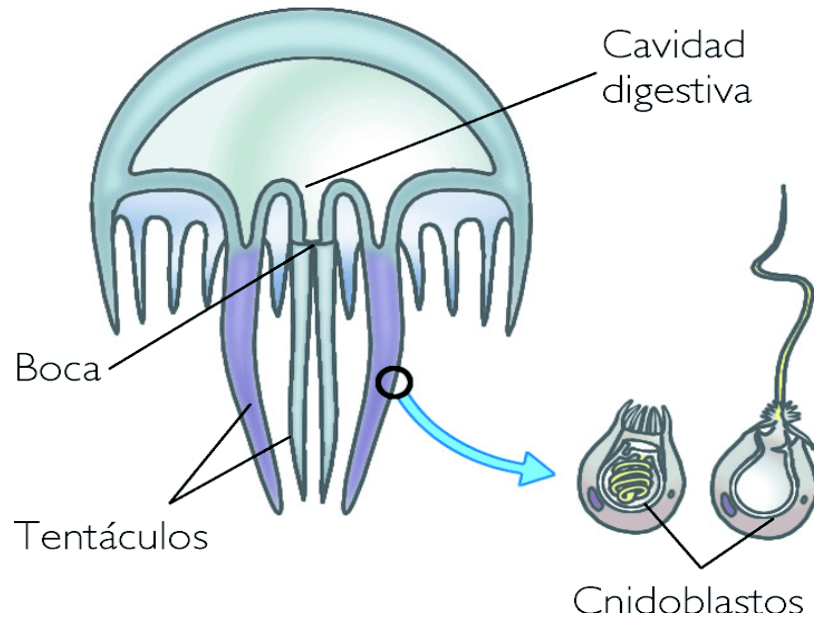


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de las medusas (boca, cavidad digestiva o gastrovascular, y tentáculos) y los cnidoblastos (tomado de Harley-Miller, 2001).

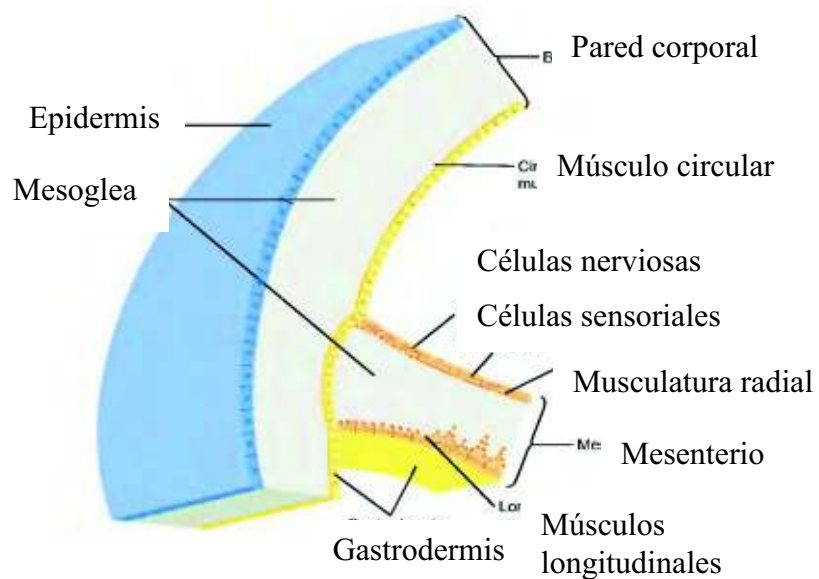


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la campana en medusas Scyphozoa, donde se señalan las diversas estructuras y tipos de tejidos (tomado de Harley-Miller, 2001).

II.1.2. Clasificación Taxonómica

En la clase Scyphozoa, se encuentran las medusas con consistencia rígida (orden Rhizostomae), donde se ubican las medusas de mayor importancia comercial en Asia (Omori y Nakamo, 2001). Dentro de los Rhizostomos, se encuentra la familia Stomolophodidae, a la cual pertenece el género *Stomolophus* spp. *Stomolophus meleagris* ha sido utilizada durante décadas para consumo humano en Asia; su taxonomía es la siguiente (Harley-Miller, 2001):

Reino Animalia

Phylum Cnidaria

Clase Scyphozoa

Orden Rhizostomae

Familia Stomolophidae

Género *Stomolophus*

Especie *meleagris*

II.2. *Stomolophus meleagris*

Las medusas Scyphozoa, y en especial *S. meleagris*, han sido poco estudiadas a nivel taxonómico y ecológico (Ocaña y Gómez, 1999). Por su abundancia y aprovechamiento pesquero, en especial en las costas de Estado de Sonora, en los últimos

años se ha generado información sobre la biología de la especie en el Océano Pacífico (Álvarez-Tello, 2007).

Esta especie se identifica por su color típicamente azul, aunque también se han observado en la naturaleza organismos blancos y cafés (Fig. 4)

Se distinguen de otras medusas por su longitud, ya que llegan a medir 15 cm de largo y presentan una cubierta en forma de campana, casi redonda, bajo la cual se observa un tronco rugoso con un orificio central donde se localizan los brazos orales (son prolongaciones del manubrio que comunica a la cavidad gástrica), de ahí el nombre de *bola de cañón* (o bala de cañón) (López y Álvarez, 2008).



Figura 4. Fenotipos blanco y azul de la medusa bola de cañón, *S. meleagris*, registrados en el estado de Sonora, México (tomado de López y Álvarez, 2008).

II.2.1. Ciclo de Vida

Estos organismos son dioicos, es decir, hay hembras y machos por separado; las gónadas se ubican en la cavidad gastrovascular., Los gametos pasan a la cavidad gastrovascular cuando están desarrollados de donde salen al exterior por la boca, por lo que la fecundación es completamente externa.

La fusión de los gametos forma una plánula que presenta forma oval irregular y su color es translúcido. Una vez que la plánula esta libre, se adhiere a un sustrato para cambiar a su estado de scyfistoma, donde empieza a tomar forma cilíndrica y a desarrollar los tentáculos y los bulbos (Fig. 5). Una vez que se han formado los bulbos, comienza la fase de estrobilación, donde los bulbos comienzan a separarse para formar los estróbilos que darán lugar a las éfiras, que son liberadas 3.5 días después de haber comenzado la estrobilación (Fig. 5).

Al ser liberadas las éfiras, da inicio la formación de la estructura medusa: su estómago va tomando la forma cóncava y los tentáculos van creciendo. Una vez que se ha tomado la forma de medusa, el ciclo de vida comienza de nuevo con la reproducción sexual (Calder, 1982).

El conocimiento de la biología reproductiva de estos organismos es escasa, sin embargo, se ha descrito de manera muy clara el proceso de desarrollo de los gametos femeninos de *S. meleagris* y de *Linuche unguiculata* (Eckelbarger y Larson, 1992).

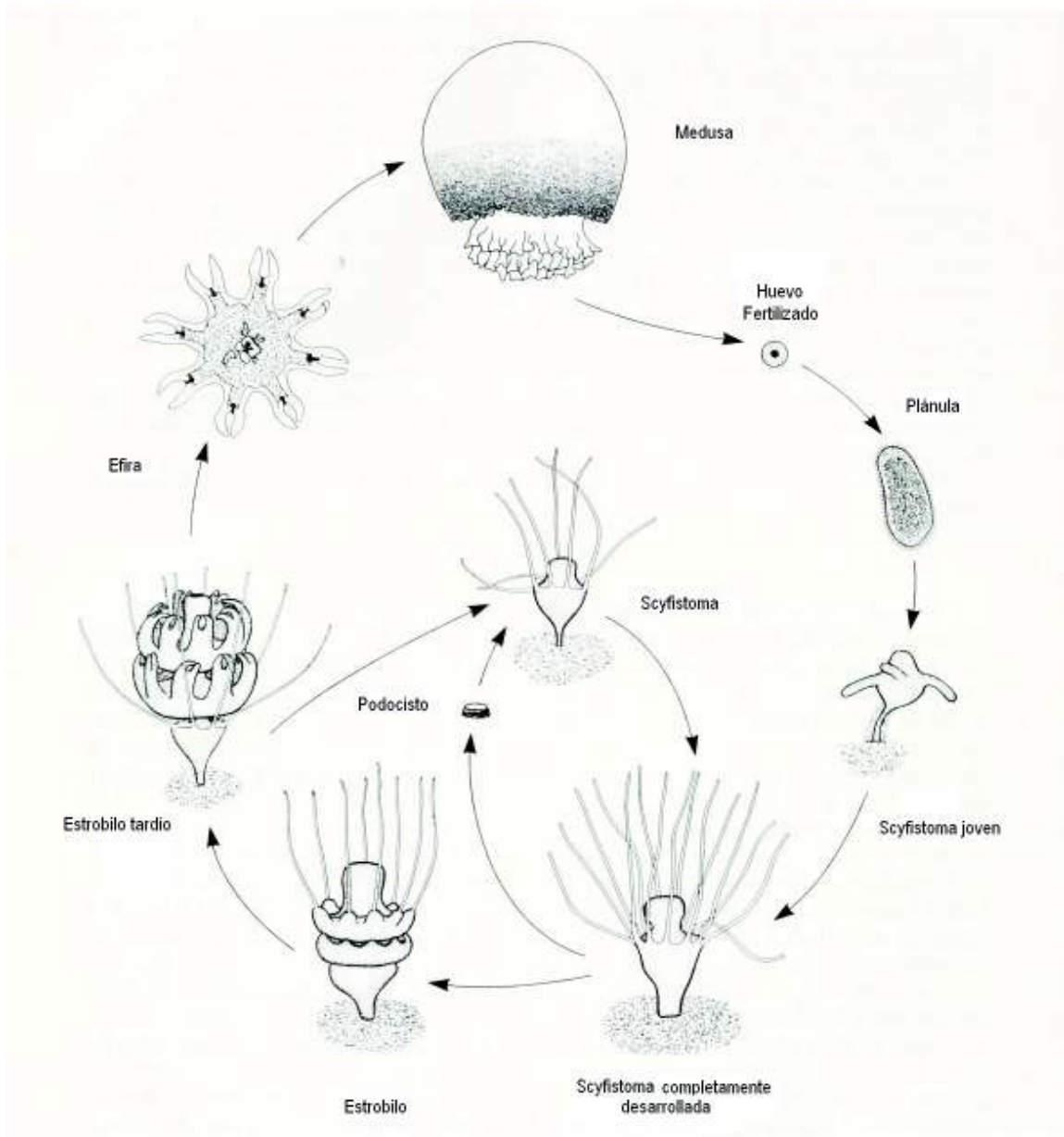


Figura 5. Ciclo de vida general del scyfozoo *S. meleagris* (modificado de Calder, 1982).

II.2.2. Distribución y Abundancia

S. meleagris se reportado en Panamá, al sureste del Atlántico, en las costas de Estados Unidos, el Golfo de México y Baja California, México (Omori y Nakamo, 2001). Su distribución en el Océano Pacífico oriental, ha sido reportada por Mayer (1910). Bigelow (1914), la menciona como parte de las especies observadas en San Diego (California) y posteriormente Kramp (1961) reportó su distribución desde el Sur de California hasta Ecuador (Ocaña y Gómez, 1999).

En las costas de México, *S. meleagris* ha sido objeto de estudio por su presencia en bahías y lagunas desde Sonora hasta Oaxaca (Ocaña y Gómez, 1999). De 1968 a 1970, el Instituto de Biología de la UNAM, realizó varios estudios acerca de la ecología de estuarios y lagunas costeras desde Sonora en Yávaros hasta San Blas en Nayarit, donde se determinó la presencia de esta especie. Se observó que los adultos predominan durante el verano-otoño; mientras que las formas jóvenes se observan en otras épocas del año, siendo la laguna de Agiabampo en la que se presentaron con mayor frecuencia y abundancia (Gómez-Aguirre, 1991).

La distribución de *S. meleagris* se relaciona generalmente con zonas litorales y ecosistemas lagunares de escasa profundidad, de 1 a 10 m, con salinidades entre 30 a 36 ‰ y temperaturas de 21 a 28 °C. En algunas zonas la densidad de organismos puede alcanzar hasta los 60 org/m³, y se localizan generalmente entre la zona de rompientes y los 3 km mar adentro, formando acumulaciones en forma de franjas y manchas irregulares o “parches” (Fig. 6).



Figura 6. Acumulaciones naturales en forma de franjas y manchas irregulares o “parches” de *S. meleagris* en Las Guásimas, Son. Temporada 2003 (Tomado de López y Álvarez, 2008).

También se ha observado una estrecha relación entre *S. meleagris* y estadios juveniles de diversas especies de peces de distribución local (Torres *et al.*, 2001). De acuerdo a la clasificación de Caddy y Griffiths (1996), la medusa bola de cañón muestra el típico comportamiento de los recursos en pulsos.

Sin embargo, presenta un periodo más o menos definido de aparición, localizándose los adultos entre los meses de Enero-Julio (aproximadamente durante 16 a

25 semanas) en el área de Las Guásimas. Se ha observado que su presencia responde en gran medida a la variabilidad ambiental, en concreto a la temperatura: incrementos de 2 °C inducen la liberación de las éfiras a la columna de agua. También se ha observado que la primera lluvia de verano induce el cambio en estructura y potencial descomposición de los organismos (López-Martínez, 2006).

En el 2001, la medusa bola de cañón fue identificada en el Sur de California y Florida (Estados Unidos de Norteamérica) como el principal componente de la biomasa y como una de las especies que han incrementado su importancia comercial, en comparación con otros invertebrados. En ese año fue reconocida por primera vez en SEAMAP (South Atlantic Shallow Water Trawl Survey), ya que en el Atlántico Sur de los Estados Unidos de Norteamérica se presentaron abundancias de 19,691 individuos, con un peso total de 9,719 kg, lo que representó más del 4% del total de especies (y el 18% de la biomasa). No obstante, después del 2001 su abundancia ha declinando año con año, como su muestra en la figura 7 (SEAMAP, 2008).

En Sonora, las investigación realizadas por CIBNOR fueron iniciadas formalmente el 12 de Junio del 2001, fecha en que se otorgó el permiso de pesca de fomento a la empresa Pesquera México, S.A. de C.V. A partir de entonces, la pesquería de medusa ha adquirido una gran importancia a nivel regional, dado que su época de captura coincide con los periodos de veda de otras especies más tradicionales (Álvarez-Tello, 2007).

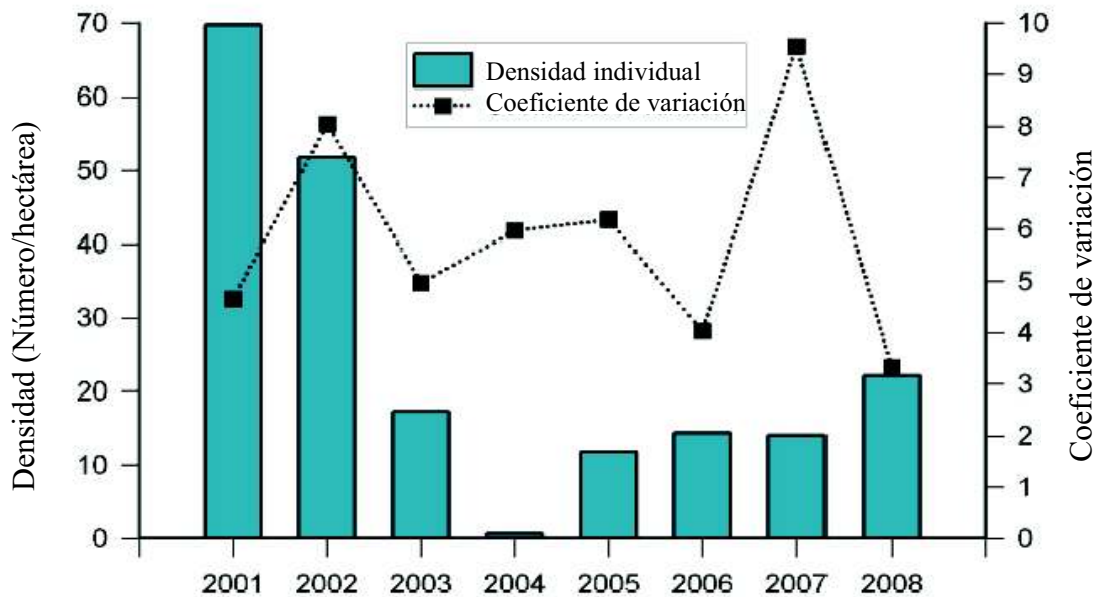


Figura 7. Densidad anual de *S. meleagris* reportada en las costas del Atlántico de los Estados Unidos, durante el periodo 2001-2008 (SEAMAP, 2008).

II.2.3. Pesquería y Usos

Hace más de 1,300 años China inició el uso medusas para consumo humano (Omori y Nakano, 2001). Posteriormente, se unieron otros países asiáticos en su explotación y consumo. En la década de los 70's, la pesquería alcanzó tal grado de desarrollo, que en 1982 la cosecha anual en todo el mundo sobrepasó las 116,000 toneladas y fueron valuadas en más de \$12.5 millones de dólares. En el 2000 la Food and Agriculture Organization (FAO) reportó que las capturas anuales sobrepasaron las

500,000 toneladas (resultando el 10% de producto terminado), cerca del 50% de este producto fue consumido únicamente en Japón (López-Martínez, 2006).

S. meleagris consiste principalmente de agua (95%) y proteína (colágeno) (5%), es baja en calorías, sin la grasa cruda perceptible, colesterol, ni cantidades de azúcar. La medusa es rica en minerales como Na, Ca, K y Mg; sin embargo, durante su procesamiento la medusa se vacía en sales, por lo que el producto final contiene una cantidad alta de aluminio, en comparación con la medusa no procesada (Peggy *et al.*, 2001).

En Japón, se le han atribuido valores medicinales como una cura eficaz para la artritis, la hipertensión, el dolor y úlceras. Además, se ha observado que tiene propiedades para ablandar la piel y mejorar la digestión, así como para remediar la fatiga y el agotamiento; estimula el flujo de sangre durante el ciclo menstrual femenino y alivia cualquier tipo de inflamación. Los chamanes aborígenes australianos han prescrito el polvo de la medusa como tratamiento para las quemaduras, sin embargo, ninguna investigación científica se ha llevado a cabo para documentar la eficacia medicinal de la medusa. No obstante, se ha supuesto que el colágeno es el ingrediente que contribuye beneficiosamente a la salud, ya que esta molécula es esencial en tejidos como el músculo, el cartílago y el hueso (Peggy *et al.*, 2001).

En el Golfo de California, las actividades pesqueras se caracterizan por estar dirigidas a unas pocas especies (tradicionalmente explotadas) para las que se ha desarrollado y está establecido toda una infraestructura de transformación, con el fin de dar valor agregado al producto. Aunque para estas pesquerías tradicionales existe un

mercado consolidado (p. ej. camarón, sardina, calamar), las capturas de estos recursos han mostrado que los niveles de extracción del producto no se incrementarán en forma sustantiva en el futuro, más bien mostraran variaciones interanuales, sin grandes incrementos (López-Martínez, 2006).

Lo anterior, ha evidenciado la necesidad de considerar la exploración y localización de recursos pesqueros potenciales como una actividad preponderante con la finalidad de ofrecer actividades pesqueras alternativas y bien dirigidas (López-Martínez, 2006).

El litoral de Sonora cuenta con una gran riqueza de especies de crustáceos, moluscos y peces no convencionales, algunos de ellos son considerados como recursos pesqueros de gran potencial, sin embargo, por el escaso conocimiento que existe sobre ellos no han sido plenamente aprovechados.

En diciembre de 2004, CONAPESCA autorizó a la Pesquera México, S.A. de C.V. el Permiso de Pesca de Fomento No. 18120303-613-03- 3387 que ampara el desarrollo del Proyecto de Investigación intitulado “Estimaciones de abundancia de la medusa bola de cañón (*Stomolophus meleagris*) al sur de Sonora para el establecimiento de una pesquería sustentable”. El 2001 fue el primer año de pesca de medusa en el área de Guásimas; sin embargo, en el 2005 y 2006 las capturas se realizaron también en el área de Guásimas y Bahía Kino (Tabla I), así como en la Boca del Río Mayo y El Choyudo, alcanzándose más de 13,000 toneladas de captura (Álvarez-Tello, 2007).

Tabla I. Capturas de *S. meleagris* en algunos puntos de pesca del estado de Sonora (México) durante el 2006 (modificado de Álvarez-Tello, 2007).

| Localidad | Materia prima | | |
|------------|---------------|--------------|---------------|
| | Campana | Piñón | Total |
| Guásimas | 5,668,572 kg | 3,873,417 kg | 9,541,989 kg |
| Yávaros | 515,920 kg | 384,732 kg | 900,652 kg |
| Bahía Kino | 1,770,917 kg | 1,180,612 kg | 2,951,529 kg |
| Total | 7,955,409 kg | 5,438,761 kg | 13,394,170 kg |

Una vez que la medusa es capturada, es llevada a la procesadora para iniciar el proceso de obtención de producto comestible, el cual puede variar de 3 a 30 días, lo que depende de las especificaciones particulares de cada cliente. Las primeras actividades en la procesadora son separar el piñón de la campana y lavar el producto para eliminar la suciedad. Posteriormente, se utiliza una mezcla de sal y alumbre para fijar los compuestos nutritivos del tejido, y evitar que se deterioren por auto-lisis o por actividad microbiana. La deshidratación de la medusa es una labor intensiva, ya que a lo largo del proceso el producto requiere continuamente de lavados, agitación y recambios de sal, lo que es ejecutado (en gran parte) de forma manual (Edwards *et al.*, 2001).

Al final del proceso, previo al empaque, el producto se estabiliza en una salmuera semi-saturada. El porcentaje de peso final que se obtiene del procesamiento de las medusas frescas es de aproximadamente el 10%, con el manto y los tentáculos; este valor puede variar de un año a otro, y depende también de la talla de los organismos y del proceso aplicado (Álvarez *et al.*, 2003).

II.3. Análisis Genéticos

Se han realizado estudios sobre la variación geográfica de especies del género *Mastigas* (Dawson y Harmer, 2003) y estudios de la ecología de *Aurelia aurita* (Dawson y Martin, 2001). Para análisis genéticos se conoce muy poco de *S. meleagris*, la única secuencia reportada en los bancos de datos internacionales (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) es un fragmento de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (GenBank AF358101), la cual se generó en un estudio filogenético realizado por Collins (2002) que considero el análisis de diversas especies de medusas. No obstante, para otras especies de medusas existen estudios genéticos extensos, como es el caso de *A. aurita* (Dawson y Martin, 2001) y *Chironex fleckeri* (Coughlan *et al.*, 2006), así como otras especies menos conocidas (Thorpe *et al.*, 2000; Dawson, 2005; Dawson, 2004; Huang *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2004; Collins, 2002; entre otros). También se han realizado varios trabajos acerca de diferencias morfológicas entre especies de medusas de los géneros *Mastigas* (Dawson y Hammer, 2003 y Dawson, 2005) y *Casiopea*, en los que se ha encontrado que las diferencias son tan insignificantes que podría tratarse de especies crípticas o hermanas (Holland *et al.*, 2004).

Este trabajo tiene importantes implicaciones, no solo en lo que se refiere a generación de conocimiento científico, sino también desde el punto de vista legal de una pesquería sustentable para la especie, debido a su importancia como recurso pesquero y las diferentes coloraciones que presenta en la naturaleza, planteando cuestionamientos

sobre comportamiento, adaptación, estructura poblacional, entre otros, los cuales son importante tomar en cuenta para la elaboración de un plan de manejo de la especie.

III. HIPÓTESIS

En la costa central de Sonora se han observado en *Stomolophus meleagris* tres patrones de coloración diferentes, los cuales se han asociado a variables ambientales, por lo que estas coloraciones corresponden a poblaciones con características genéticas distintivas de una misma especie ó estos patrones corresponden a diferentes especies.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Determinar si los fenotipos (azul, blanco y morado) de la medusa bola de cañón (*Stomolophus meleagris*) presente en Las Guásimas y Bahía de Kino, Sonora, corresponden a una misma especie.

IV.2. Objetivos Particulares

Evaluar fragmentos de ~660 pb del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI).

Estimar la diversidad genética de *S. meleagris* en Las Guásimas y Bahía de Kino, Sonora.

Determinar la estructura genética de *S. meleagris* a escala local.

Determinar si existe correlación entre la distribución de los fenotipos azul y blanco, en Las Guásimas, y los parámetros fisicoquímicos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Colecta de Organismos

Los organismos se colectaron en las localidades de Bahía de Kino, Las Guásimas y Yaváros (para determinar estructura genética) en el estado de Sonora (México), mediante colecta directa con redes de cuchara de 5''. Se hicieron registros de localidad, arte de colecta, colector, coordenadas geográficas, temperatura superficial del agua, salinidad y oxígeno disuelto; se tomaron muestras de agua de mar a una profundidad aproximada de 1 metro para la determinación de clorofilas (productividad primaria) y nutrientes (fosfatos, nitratos y nitritos). Los organismos se conservaron en fresco y se mantuvieron en hieleras con agua de mar fría (enfriada con bolsas de hielo) durante su transporte al laboratorio especializado de pesquerías en la Unidad Guaymas del CIBNOR. En Guaymas, se tomaron datos morfométricos, fenotípicos y los organismos se documentaron mediante fotografía digital.

Posteriormente, cada ejemplar se diseccionó con un bisturí, tomando aproximadamente 10 gr de tejido de la campana que se colocaron en frascos de polipropileno de 250 mL. El tejido se fijó con etanol al 70% diluido con agua de mar, en proporción 1:2 (v/v) durante 24 horas, posteriormente se realizó un recambio de alcohol del 100%. Las muestras fijadas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento para la extracción del ADN total.

V.2. Extracción y Purificación de ADN Total

Para elegir el protocolo de extracción óptimo para el aislamiento de ADN a partir de muestras de tejido preservadas en etanol al 70%, se realizaron pruebas con diferentes protocolos reportados en la literatura (Tabla II).

Tabla II. Lista de protocolos de extracción de ADN total ensayados.

| PROTOCOLO | REFERENCIA |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| CTAB 2% | Berntson <i>et al.</i> , 2001 |
| DNAzol | Chomczynski <i>et al.</i> , 1997 |
| Proteinasa K y RNAsa | Lee, 2000 |
| Extracción de ADNg para peces | Leyva, 2003 |
| Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico | modificación de Leyva, 2003 |
| Acetato de amonio 7.5 M | modificación de Leyva, 2003 |

V.3. Cuantificación y Verificación de la Integridad del ADN

La pureza del ADN se cuantificó y determinó mediante espectrofotometría con luz UV por el método de Warburg-Christian (1941). La integridad del ADN se verificó en geles de TBE (TBE 10X: Tris 108 gr, ác. Bórico 55 gr, EDTA 0.5 M pH 8.0 20 mL, aforado a un litro) agarosa al 1% preteñidos con bromuro de etidio, llevándose a cabo una electroforesis en una cámara horizontal (Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad) a 70V durante 1 hr a temperatura ambiente.

Los geles se observaron bajo luz UV y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc (UVP, England). La concentración de las muestras de ADN se estandarizó a una concentración final de 100 ng/ μ L (para las reacciones de PCR) mediante cuantificación a 260 nm en un Nanodrop (Mod. Nd2000, Thermo Scientific) y ajuste del volumen con agua miliQ estéril.

V.4. Amplificación Parcial de Genes

El ADN obtenido se usó como templado para la amplificación de fragmentos específicos de los genes: COI, COIII, 12S, 16S, D-Loop (región de control) e ITS1 mediante PCR, usando los cebadores citados en la Tabla III.

Tabla III. Relación de cebadores usados para amplificación de fragmentos de genes específicos.

| Región | Nombre | Secuencia | Tamaño (pb) |
|--------|---------------|----------------------------------|-------------|
| COI | LCOI1490COIF | 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' | 700 |
| | HCO2198COIR | 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' | |
| COIII | L8618COIIIF | 5'-CATGATAACACATAATGACCCACCAA-3' | 700 |
| | H9323 | 5'-ACTACGTCTACGAAATGTCAGTATCA-3' | |
| 12S | SM12F2 | 5'-GTCAGGTCGAGGTGTA-3' | 200 |
| | SM12R2 | 5'-TGCACCTTCCGGTACA-3' | |
| 16S | SM16F2 | 5'-ACCTGTATGAATGGCA-3' | 450 |
| | SM16R2 | 5'-CTCAGATCACGTAGGA-3' | |
| D-Loop | FISHCR | 5'-CWTATCATKMATGATAWG-3' | 1,000 |
| ITS1 | ITS SSU 1400F | 5'-TGYACACACCGCCCGTC-3' | 1,339 |
| | ITS LSU DIC R | 5'-ACTCTCTTTTCAAAGTCCTT-3' | |

En cada reacción de PCR, se mezcló 1 μ L de cada cebador (forward y reverse) a una concentración de 10 pmol/mL. La mezcla de reacción contenía: 1 μ L de ADN (100 ng), 2 μ L del cóctel de cebadores, 5 μ L de buffer PCR 10X, 1 μ L de dNTP's (10mM), 2.5 μ L de MgSO₄, 15 μ L de Enhancer (Ralser *et al.*, 2006), 23.3 μ L de agua mili-Q estéril y 1U de Taq pol (0.2 μ L). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Corbett (Mod. CG1-96) utilizando los programas mostrados en la Tabla IV.

Los productos de amplificación se separaron en geles de TBE–agarosa al 2% preteñidos con bromuro de etidio, llevándose a cabo la electroforésis en una cámara horizontal (Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad) a 70V durante 1 hr a temperatura ambiente.

Los geles se observaron bajo luz UV en un transiluminador y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc (UVP, England).

Tabla IV. Programas utilizados para amplificación específica de diversos genes mitocondriales de *S. meleagris*.

| Gen | Etapa | Temperatura/Tiempo | Ciclos |
|----------------------|-------------------|--------------------------------|--------|
| COI | Desnaturalización | 94°C/5' | 1 |
| | Pre-alineamiento | 94°C 1'/45°C 1'30"/72°C 1'30" | 5 |
| | Alineamiento | 94°C 30"/45°C 1'/72°C 1'30" | 35 |
| | Extensión | 72°C 10' | 1 |
| COIII | Desnaturalización | 95°C/5' | 1 |
| | Pre-alineamiento | 95°C 1'/47°C 1'/72°C 1'30" | 5 |
| | Alineamiento | 95°C 30"/46°C 1'30"/72°C 1'30" | 35 |
| | Extensión | 72°C 10' | 1 |
| 12S D-Loop 16S | Desnaturalización | 94°C/5' | 1 |
| | Alineamiento | 94°C 30"/40°C 30"/72°C 30" | 40 |
| | Extensión | 72°C 10' | 1 |
| ITS1 | Desnaturalización | 94°C/5' | 1 |
| | Alineamiento | 94°C 30"/50°C 30"/72°C 30" | 30 |
| | Extensión | 72°C 10' | 1 |

V.5. Purificación y Secuenciación de Amplicones

Los productos de PCR de los genes COI y 12S (Tabla III) fueron purificados mediante el método de silica gel (Davies *et al.*, 1986), y enviados a MACROGEN (<http://www.macrogen.com>) para su secuenciación en ambas direcciones por el método de Sanger (Ausubel *et al.*, 1992).

V.6. Análisis de Secuencias

Las secuencias de nucleótidos se verificaron visualmente a partir de los electroferogramas proporcionados por el servicio de secuenciación. Las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y, cuando fue necesario, se editaron utilizando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Se realizaron análisis de alineamiento entre los fenotipo usando el programa DNAMAN y MEGA4.

Adicionalmente, se realizaron análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas en el presente estudio con aquellas reportadas en el NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Las relaciones evolutivas se determinaron utilizando el programa PAUP Ver. 4.0 (Swofford, 2000), y los análisis de genética poblacional se realizaron utilizando el programa ARLEQUIN Ver. 3.1. (Schneider *et al.*, 2000).

El nivel de polimorfismo de cada localidad o población se estimó como el número de sitios polimórficos (S), diversidad génica o haplotípica (H_e , Nei, 1987), el número medio de diferencias nucleotídicas pareadas (k, Tajima, 1983), diversidad nucleotídica (π , Nei, 1987).

Las divergencias genéticas pareadas entre poblaciones se estimaron utilizando el índice de fijación (ϕ_{ST} , Excoffier *et al.*, 1992) el cual incluye información sobre la frecuencia haplotípica mitocondrial (Weir y Cockerham, 1984).

V.7. Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Para el análisis PCR-RFLP se tomaron 5 μ L de los productos de la amplificación de la región ITS1 (1,300 pb, Tabla III) que fueron digeridos (de acuerdo a las instrucciones del fabricante) con las enzimas de restricción presentadas en la Tabla V.

Tabla V. Listado de enzimas de restricción utilizadas en el presente estudio. (Notas: ¹Boehringer Mannheim; ²New England Bio Labs)

| No. | Enzima | Buffer | Sitio de corte | No. | Enzima | Buffer | Sitio de corte |
|-----|-----------------|--------------------|----------------|-----|----------------|--------------------|----------------|
| 1 | <i>Alu</i> I | ¹ BM A | AG ↓CT | 9 | <i>Hinc</i> II | ² NEB 3 | GTY ↓RAC |
| 2 | <i>Bam</i> HI | ¹ BM B | G ↓GATCC | 10 | <i>Hinf</i> I | ² NEB 4 | G ↓ANTC |
| 3 | <i>Eco</i> RI | ¹ BM H | G ↓AATC | 11 | <i>Msp</i> I | ² NEB 4 | CC ↓GG |
| 4 | <i>Hae</i> III | ¹ BM M | G ↓CC | 12 | <i>Nla</i> III | ² NEB 4 | CATG ↓ |
| 5 | <i>Hind</i> III | ¹ BM B | A ↓AGCTT | 13 | <i>Xba</i> I | ² NEB 4 | T ↓CTAGA |
| 6 | <i>Pst</i> I | ¹ BM H | CTGCA ↓G | 14 | <i>Kpn</i> I | ² NEB 1 | GGTAC ↓C |
| 7 | <i>Sst</i> I | ² NEB U | AAT ↓ATT | 15 | <i>Sal</i> I | ² NEB 3 | G ↓TCGAC |
| 8 | <i>Aci</i> I | ² NEB 3 | C ↓CGC | 16 | <i>Nde</i> I | ² NEB 4 | CA ↓TATG |

Las reacciones de digestión se llevaron a cabo de la siguiente manera: 5 μ L de ADN (de un stock 1 μ g/ μ L), 2.5 μ L de 10X buffer, 0.2 μ L de la enzima a probar (de un stock 10 U/ μ L), y 21.3 μ L de agua destilada estéril. Las digestiones se incubaron a 37°C en un baño María durante 2 hr (Sambrook y Russell, 2001). Después del periodo de

incubación los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis submarina en geles de poliacrilamida/TBE 15% (Ready Precast Gels, BioRad) usando como referencia de movilidad el 20 bp EZ Load Molecular Ruler (BioRad). A 25 μ L de cada reacción se le adicionaron 5 μ L de LB buffer (50% glicerol, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.25 % de azul de bromofenol) y se cargaron en los geles. Las electroforesis se desarrollaron a 70V durante 2.3 h a temperatura ambiente en un sistema de electroforesis Mini Protean II (BioRad). Los geles se tiñeron con SYBR Gold (Invitrogen)/TBE 1X (1:50,000 v/v), durante 30 min. Los resultados se fotodocumentaron y analizaron mediante el sistema UVIDoc (UVP, England) determinado el número y tamaño de las bandas obtenidas, para generar una base de datos de patrones de bandeo para cada población y especie.

V.8. Análisis de Correlación

Para establecer los posibles patrones de correlación entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia y/o abundancia de los fenotipos observados *de S. meleagris*, se usó el método de regresión lineal usando el software Microsoft® Excel (2007) con la generación de gráficos tipo XY, calculando las ecuaciones que las describen y determinando el factor de correlación (R^2).

VI. RESULTADOS

VI.1. Colecta de Organismos

Se colectaron un total de 184 organismos de tres fenotipos diferentes (patrones de coloración) en Abril y Mayo del 2008 y en Junio y Agosto del 2009, en los puntos de muestreo (Tabla VI). Se documentaron los diferentes fenotipos muestreados encontrándose el fenotipo azul como el más abundante.

Tabla VI. Relación de organismos muestreados, por localidad y fenotipo (blanco, azul y morado).

| Fecha | Localidad | Fenotipo | No. de organismos |
|----------------|------------|----------|-------------------|
| 10-abril-2008 | Guásimas | Azul | 18 |
| 11-abril-2008 | Guásimas | Blanco | 8 |
| 14-abril-2008 | Bahía Kino | Azul | 15 |
| 15-abril-2008 | Yávaros | Azul | 1 |
| 16-abril-2008 | Yávaros | Azul | 13 |
| 17-abril-2008 | Guásimas | Azul | 7 |
| 17-abril-2008 | Guásimas | Blanco | 33 |
| 18-abril-2008 | Guásimas | Azul | 15 |
| 21-abril-2008 | Guásimas | Azul | 16 |
| 21-abril-2008 | Guásimas | Blanco | 2 |
| 25-abril-2008 | Guásimas | Azul | 18 |
| 29-abril-2008 | Bahía Kino | Azul | 15 |
| 30-mayo-2008 | Guásimas | Azul | 8 |
| 05-junio-2009 | Bahía Kino | Morado | 6 |
| 29-agosto-2009 | Bahía Kino | Morado | 9 |

Los organismos con fenotipo azul presentaron lunares pequeños (Fig. 8), oscuros, generalmente en el borde de la campana; sin embargo, también se observaron organismo de color azul intenso con campana lisa.

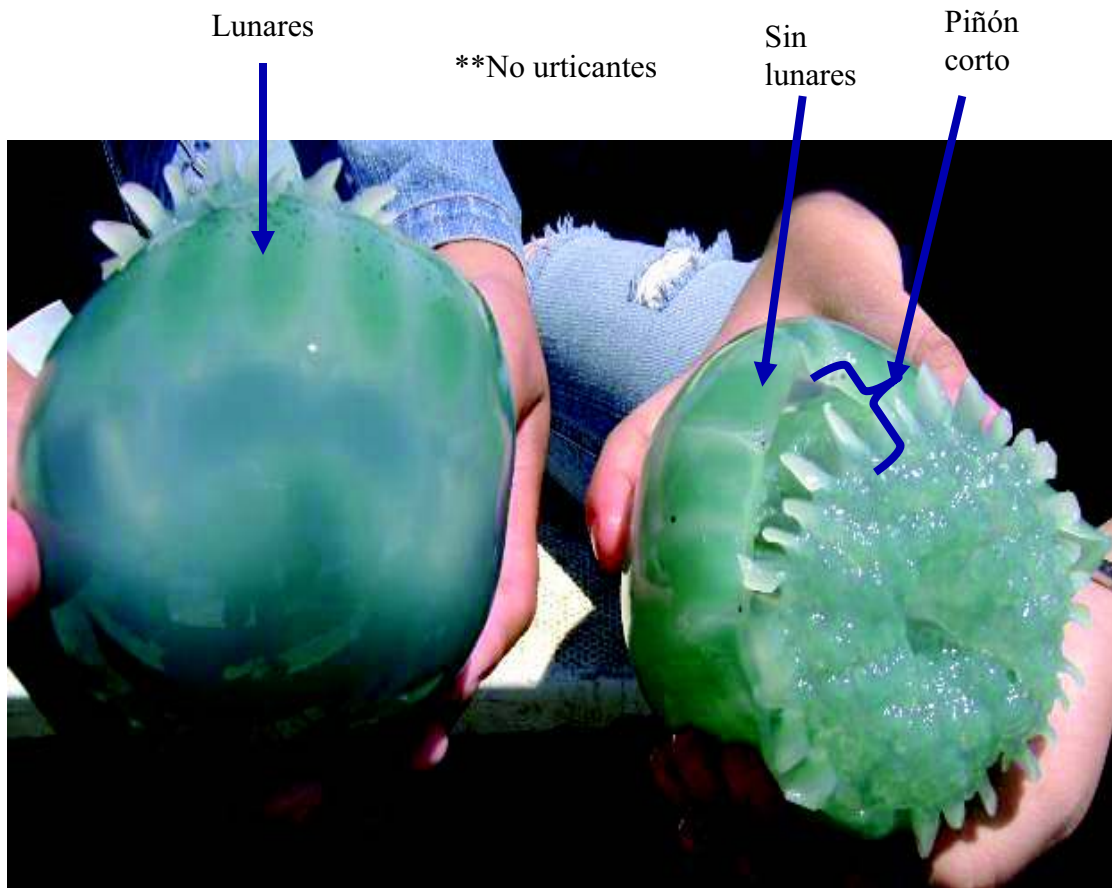


Figura 8. *S. meleagris* fenotipo azul, colectada en las Guásimas (Son.), durante Abril-Mayo del 2008.

En el caso de organismos de fenotipo blanco, las tonalidades observadas fueron variadas, desde blanco-azulado y blanco-marfil, hasta blanco-café. Al igual que las medusas de fenotipo azul, en algunos organismos blancos se observaron lunares (puntos) pequeños, oscuros (Fig. 9).

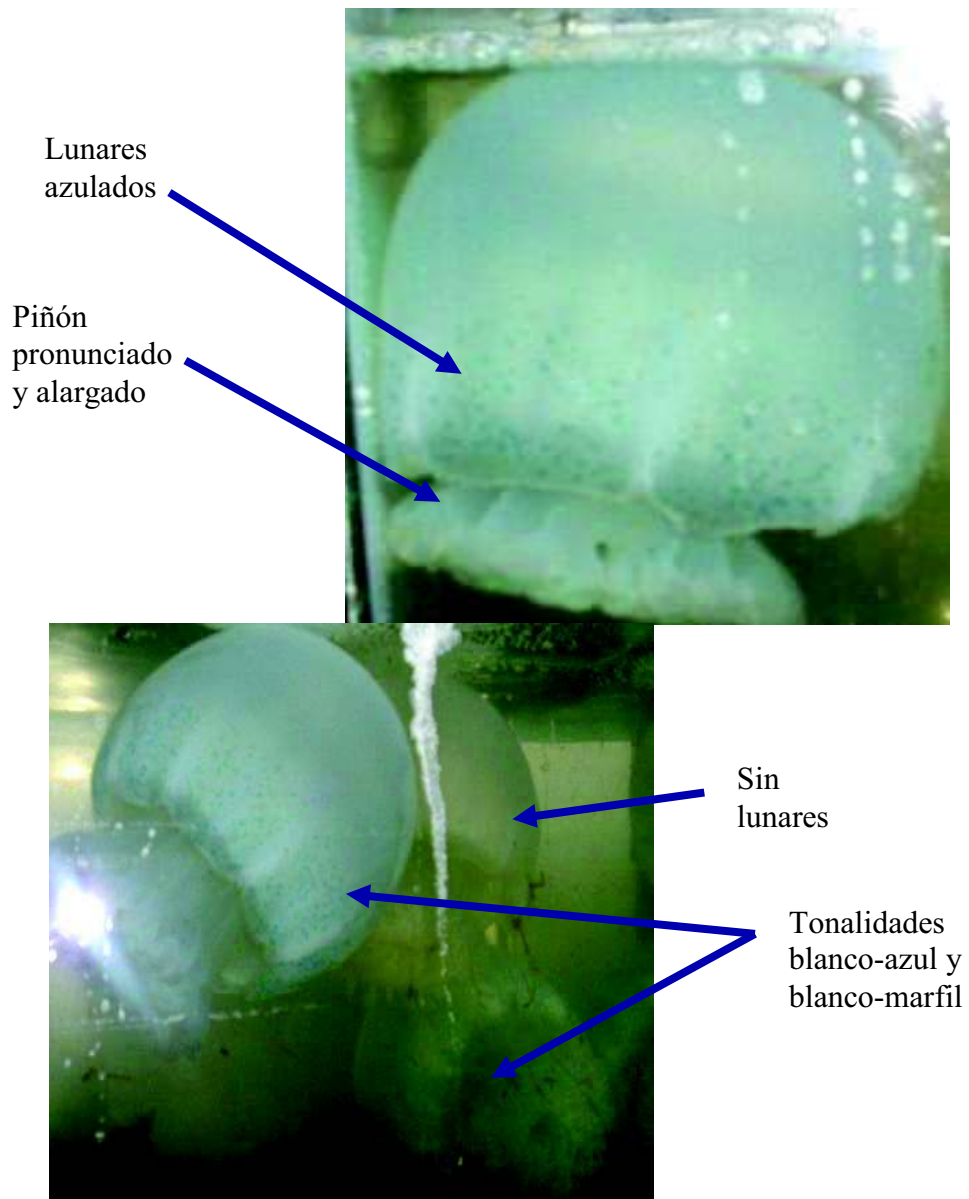


Figura 9. *S. meleagris* fenotipo blanco, colectada en las Guásimas (Son.), durante Abril del 2008.

Los organismos con fenotipo morado fueron los más variables, presentaron coloraciones: 1) morada-oscura intensa, sin lunares (Fig. 10A); 2) blanca-transparente con tonalidad morada y grandes lunares de color morado oscuro (Fig. 10B); hasta 3) morado-transparente con abundantes lunares medianos, oscuros, en las partes media y superior de la campana, y escasos en el borde de la campana donde se deja ver una coloración morada-blanca (Fig. 10C).

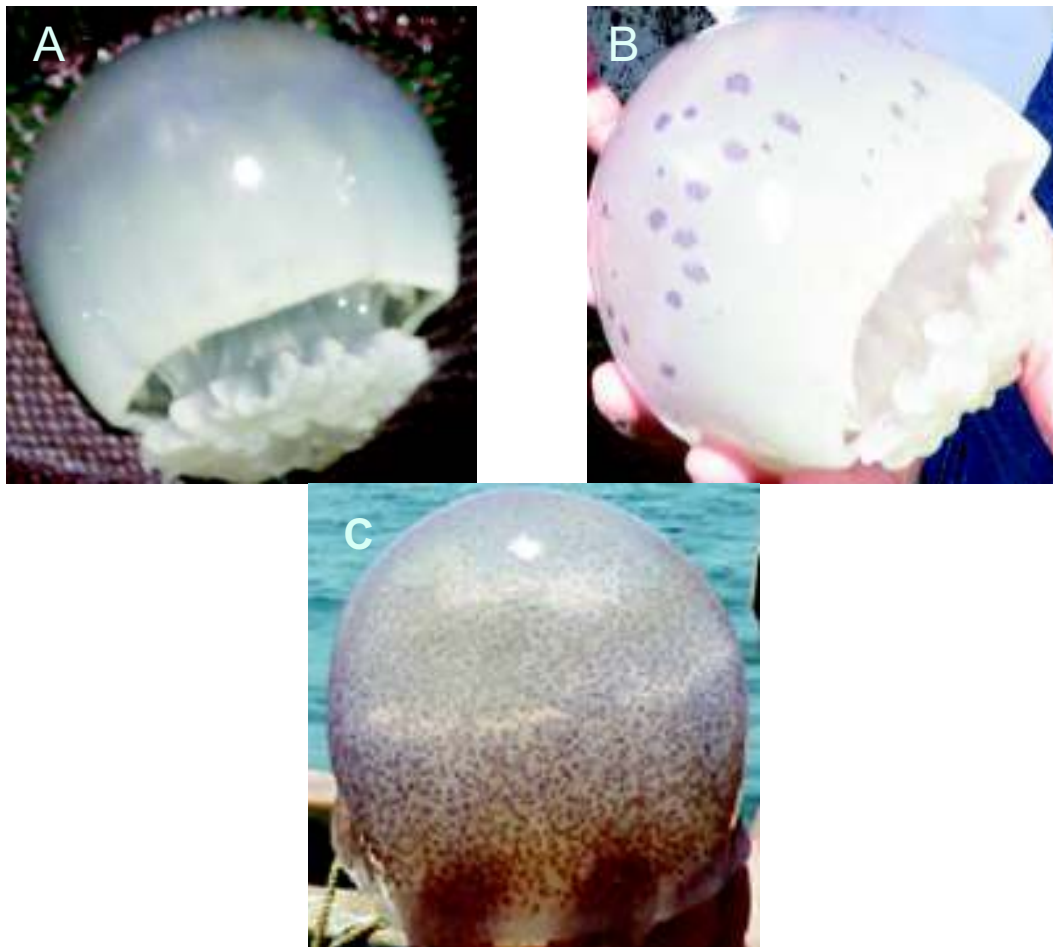


Figura 10. *S. meleagris* fenotipo morado, en sus diferentes variantes. A) morado intenso sin lunares, B) blanco transparente con tonalidad morada y lunares oscuros grandes, y C) morado transparente con lunares medianos oscuros en la campana. Sitio de Colecta, Bahía Kino, Junio-Agosto del 2009.

VI.2. Extracción, Amplificación, Purificación y Secuenciación de Genes

De las pruebas realizadas para estandarizar el protocolo de extracción de ADN total, se modificó el protocolo CTAB 2% descrito por Berntson *et al.* (2001), logrando los mejores resultados en pureza e integridad del ADN (datos no mostrados). El procedimiento, se desarrolló de la siguiente manera: el tejido se digirió con 600 μ L de buffer de lisis (1.4M NaCl, 0.02M EDTA, 0.1M Tris- HCl pH 8.0, 2% CTAB y 0.2% 2 β -mercaptoetanol) y 10 μ L de proteinasa K (10mg/mL). Se incubó durante 2 h a 55°C, agitando los tubos cada 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 2 μ L de RNAsa y se dejó incubar durante 1 h a 37°C. Se agregaron 600 μ L de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se centrifugó a 14,000xg durante 10 min a 25°C. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se le agregó 1 volumen de etanol absoluto para la precipitación de los ácidos nucleicos, dejándolos toda la noche a -20°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14,000xg durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó. Al botón obtenido (ADN) se le hizo un lavado con etanol 70%, centrifugando, finalmente a 17,000xg durante 20 minutos a 4°C. Para eliminar residuos de etanol, los tubos se secaron al aire (temperatura ambiente) y el pellet resultante se re-suspendió en 50 μ L de TE.

Una vez realizadas las pruebas y elegido el protocolo de extracción, se realizó la extracción del ADN total de las 184 muestras que se colectaron (ejemplo, Fig. 11).

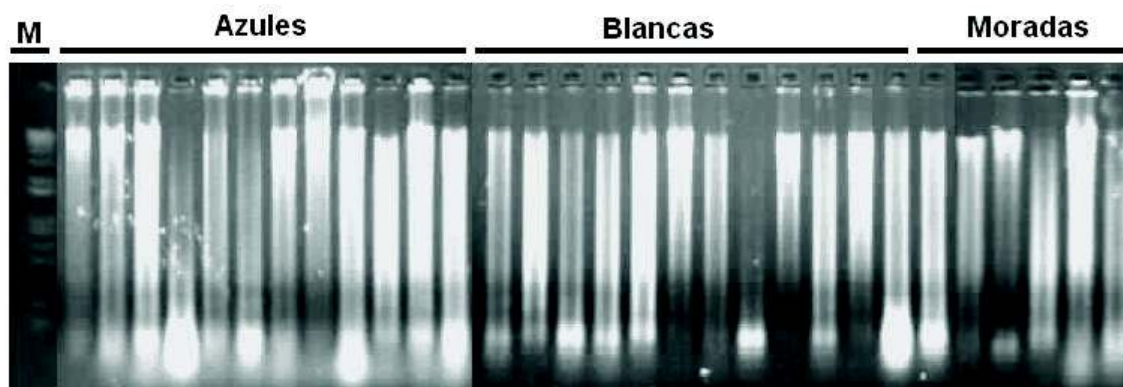


Figura 11. Electroforésis TBE–agarosa al 1% de ADN genómico de los diferentes fenotipos de medusa bola de cañón *S. meleagris*. M, marcador de peso molecular. Técnica de tinción EtBr.

Aunque no se pudo eliminar todo el RNA de las muestras, y estas presentaron cierto grado de degradación, el ADN total presentó la calidad y limpieza suficiente (valores de Abs260/Abs280 entre 1.7 y 2.0) para utilizarse como templado para la PCR. Aunque se probaron 6 parejas de cebadores “universales” y se probaron variaciones de algunos parámetros de amplificación (temperatura de alineamiento, tiempo de extensión, concentración de la fuente de Mg^{+2} y/o del templado de ADN, uso y concentración de mejoradores -enhancers-, cantidad de Taq polimerasa y concentración de dNTP’s, para cada par), solo fue posible obtener productos de amplificación consistentes, enfocados y reproducibles al utilizar los cebadores que amplifican regiones específicas de los genes 12S (Fig. 12) y COI (Fig. 13) del ADN mitocondrial (mtDNA).

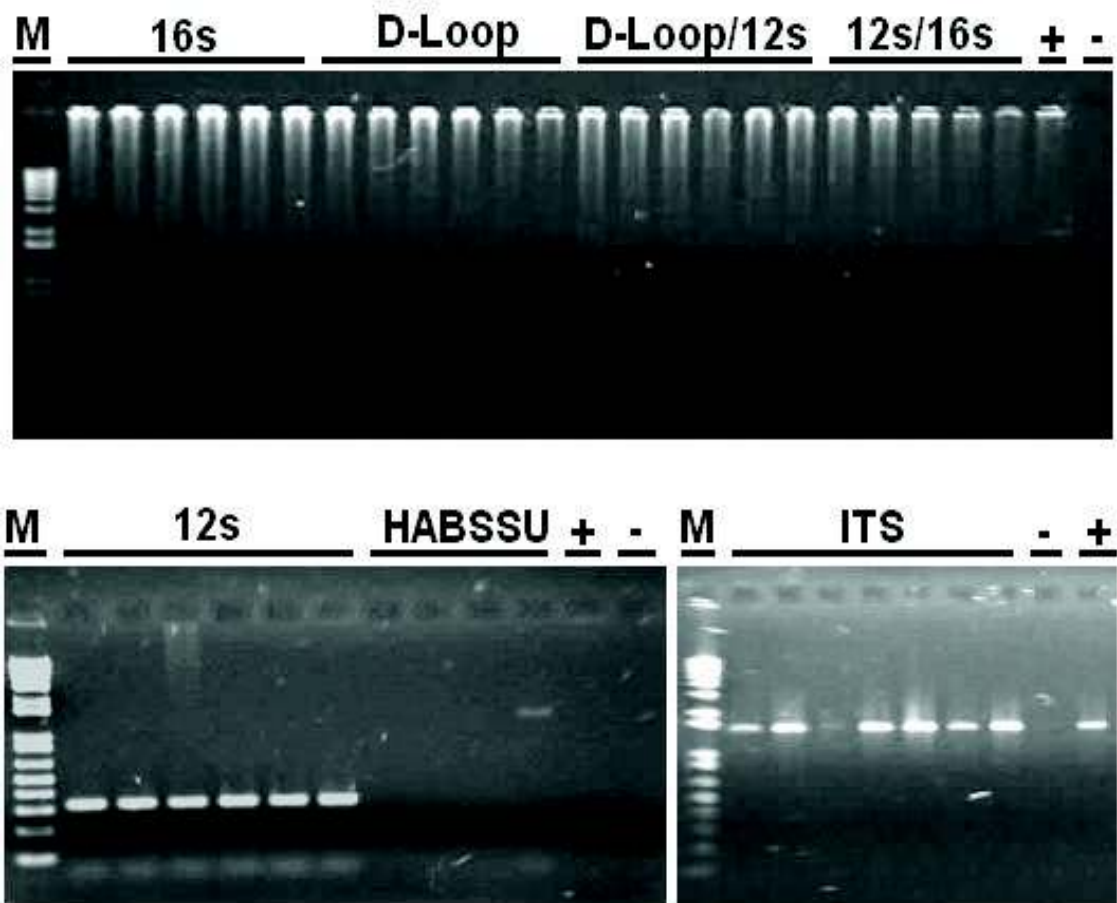


Figura 12. Electroforésis en gel de TBE-agarosa al 1% de productos de PCR de prueba de diversos oligonucleótidos y sus combinaciones (ver tablas 3 y 4). Líneas: 16s, gen 16s ribosomal; D-Loop, región control; D-Loop/12s combinación D-Loop forward y 12s reverse; 12s/16s, combinación 12s forward y 16s reverse; 12S, gen 12s ribosomal; HAB SSU, subunidad pequeña universal para eucaria; ITS1, región de secuencias intertranscritas; M, marcador molecular 1kp plus (BioRad); (+), control positivo y (-), control negativo. Técnica de tinción: EtBr.

En la figura 13 se muestran los amplicones obtenidos (31) para su secuenciación, de cada uno de los genes analizados (COI y 12S) en los tres fenotipos de *S. meleagris*.

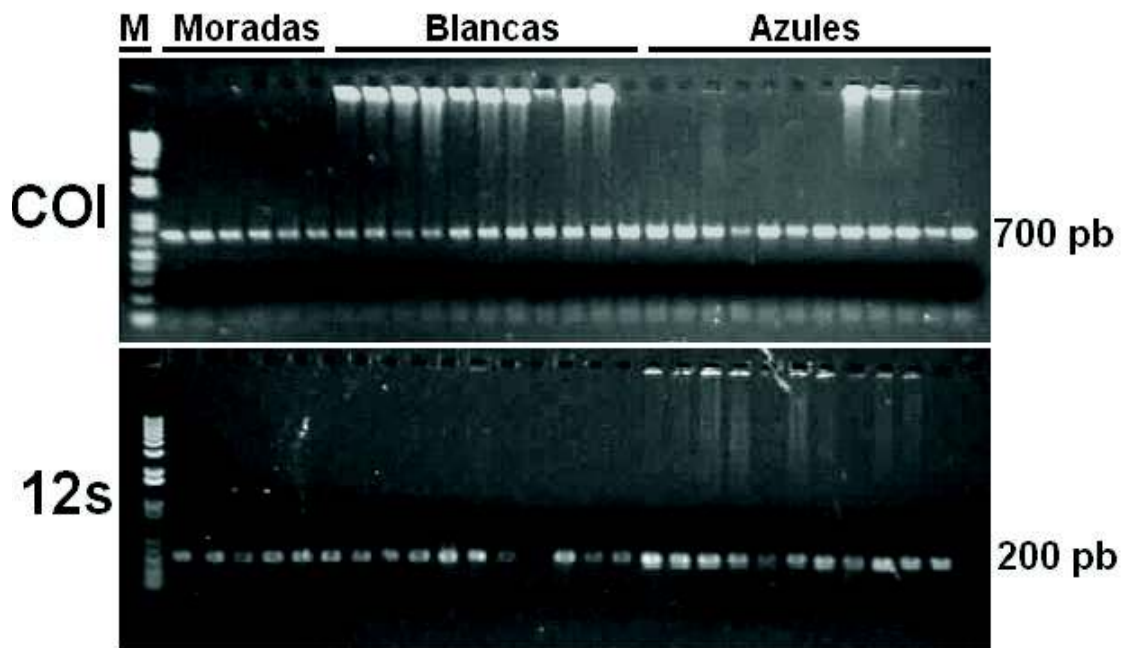


Figura 13. Electroforesis en gel de TBE-agarosa al 1% de productos de PCR de los genes: COI (~700bp) y 12S (~200pb) para los diferentes fenotipos de *S. meleagris*. M, marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen). Técnica de tinción: EtBr.

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos, se verificaron visualmente a partir de los electroferogramas (Fig. 14).

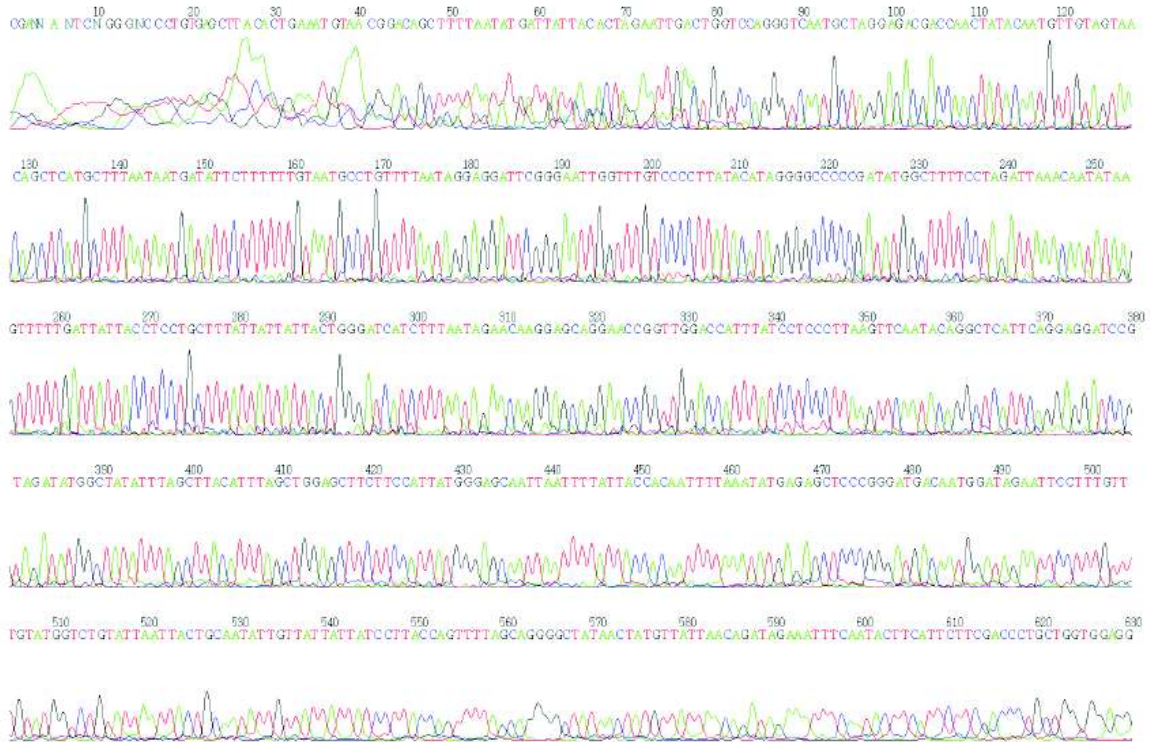


Figura 14. Electroferograma de un producto de PCR-COI de *S. meleagris*. Se muestra la secuencia de nucleótidos, teniendo el siguiente código de señal (colores): adenina, verde; guanina, negro; citosina, azul y timidina, rojo.

Las secuencias de nucleótidos se alinearon utilizando el programa Clustal X y se editaron utilizando el programa DNAMAN. Finalmente se obtuvieron 28 secuencias limpias del gen COI y 20 secuencias del gen 12S, con longitudes de 635 y 195 pb, respectivamente (Fig. 15 y 16).



Figura 15. Análisis de alineamiento de las secuencias de nucleótidos de 635 bases del gen COI de los fenotipos blanco (MB), azul (MA) y morado (MBG) de *S. meleagris*, colectada en las Guásimas (G) y Bahía Kino (BK), Sonora.

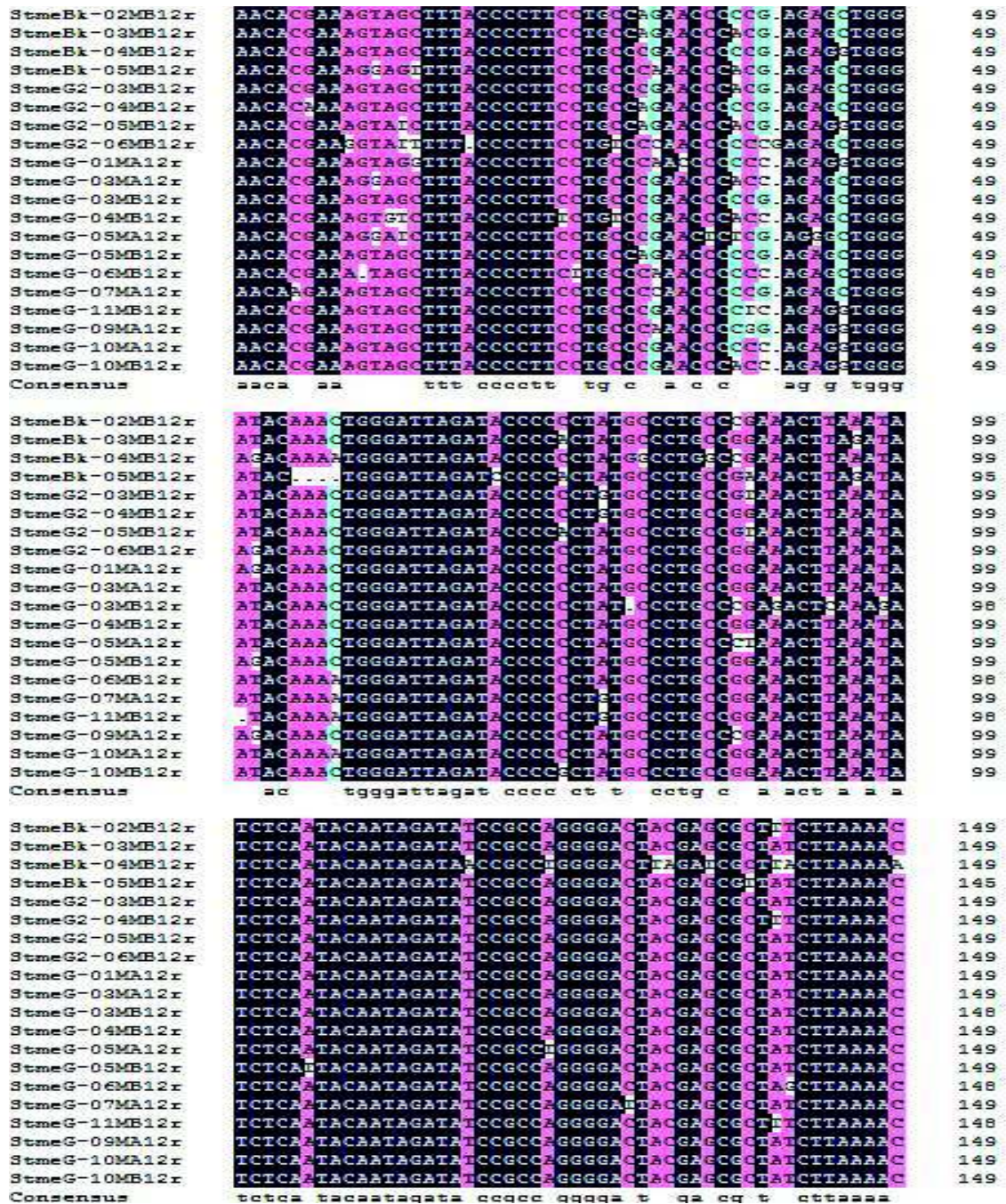


Figura 16. Análisis de alineamiento de las secuencias de nucleótidos de 195 bases del gen 12S ribosomal de los fenotipos blanco (MB), azul (MA) y morado (MBG) de *S. meleagris*, colectada en las Guásimas (G) y Bahía Kino (Bk), Sonora.

VI.3. Análisis de Secuencia de los Genes COI y 12S

Las secuencias de nucleótidos analizadas del gen COI y del gen 12S mostraron que su composición de nucleótidos no presenta diferencias significativas entre fenotipos (Tabla VII).

Tabla VII. Características generales de las secuencias de nucleótidos de los genes COI y 12S de *S. meleagris*.

| Fenotipo | Gen COI | | | | | | Gen 12 s | | | | | |
|----------|---------|-------------|-----------------|------|------|------|----------|-------------|-----------------|------|------|------|
| | No. sec | Tamaño (pb) | Composición (%) | | | | No. sec | Tamaño (pb) | Composición (%) | | | |
| | | | T | C | A | G | | | T | C | A | G |
| Azul | 10 | 635 | 36.5 | 17.0 | 27.4 | 19.1 | 6 | 195 | 20.4 | 30.3 | 28.5 | 20.7 |
| Blanco | 13 | 635 | 36.6 | 17.0 | 27.4 | 19.0 | 10 | 195 | 20.7 | 30.8 | 28.2 | 21.0 |
| Morado | 5 | 635 | 36.5 | 17.1 | 27.4 | 19.0 | 4 | 195 | 21.2 | 28.2 | 29.1 | 20.6 |
| Total | 28 | 635 | 36.6 | 17.0 | 27.4 | 19.0 | 20 | 195 | 20.7 | 30.0 | 28.5 | 20.8 |

En la Tabla VIII se muestran los cinco hits más altos obtenidos (porcentaje de identidad) así como el gen correspondiente, el número de nucleótidos comparados y los números de acceso de secuencias de las especies con las que se obtuvo similitud. En la mayoría de los casos las identidades altas no se dan con la especie homóloga reportada por Collins (2002), sino con otras especies o con especies genéticamente relacionadas.

En el caso del gen COI, las mayores similitudes se obtuvieron con organismos de los órdenes Rhizostomeae y Semaestomeae (ambos pertenecientes a la clase

Scyphozoa), a los que pertenecen las especies *Rhopilema esculentum* y *Nemopilema nomurai*, y *Aurelia aurita*, respectivamente.

El mayor porcentaje de similitud, se obtuvo con *R. esculentum* (83%), de la familia Rhizostomatidae, al igual que los géneros *Neopilema* y *Stomolophus*. Aunque se pudo ubicar mediante esta identificación molecular el grupo taxonómico al que pertenece *S. meleagris* (Scyphozoa), no fue posible comparar la secuencia del gen COI con registros previos ya que no existen. Sin embargo, para la especie existe un único registro que corresponde a la subunidad pequeña del ADN ribosomal (AF358101). Cabe resaltar que los datos contrastan con los encontrados para *A. aurita* del orden Semaestomeae, ya que cuenta con 102 secuencias de nucleótidos registradas que corresponden a genes ribosomales, COI y secuencias para determinación de origen de la fase pólipo en esta especie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>).

Para el gen 12S las mayores similitudes se obtuvieron con organismos del orden Clupeiformes, encontrándose con *Sardinops melanostictus* un 94% de similitud. No se pudo identificar el grupo taxonómico, como en el caso del gen COI, ya que además de existir pocos estudios moleculares de la familia Rhizostomatidae, éste gen no ha sido considerado en ellos, siendo las secuencias generadas en el presente estudio, tanto para el gen 12S como para el COI, los primeros registros para *S. meleagris*.

Tabla VIII. Análisis de alineamiento de secuencias de nucleótidos con bases de datos mundiales (NCBI, Blastn).

| Gen | Orden | Especie | No. Id | Tamaño (pb) | Fecha de registro (dd/mm/aa) | Identidad (%) <i>S. meleagris</i> |
|---------------------------|--------------|--------------------------------|----------|-------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Citocromo oxidasa I (COI) | Rhizostomeae | <i>Rhopilema esculentum</i> | EU373722 | 633 | 31/12/08 | 523/624 (83%) |
| | | <i>R. esculentum</i> | EU373724 | 633 | 31/12/08 | 525/628 (83%) |
| | | <i>R. esculentum</i> | EU373723 | 633 | 31/12/08 | 522/628 (83%) |
| | Semaestomeae | <i>Nemopilema nomurai</i> | EU373728 | 645 | 31/12/08 | 525/634 (82%) |
| | | <i>Aurelia aurita</i> | AY903210 | 658 | 06/11/05 | 510/617 (82%) |
| 12 s ribosomal | Clupeiformes | <i>Sardinops melanostictus</i> | AB032554 | 16,881 | 23/11/03 | 185/195 (94%) |
| | | <i>Alosa aestivalis</i> | DQ912041 | 582 | 11/06/07 | 175/195 (89%) |
| | | <i>Alosa pseudoharengus</i> | AP009132 | 16,664 | 12/06/07 | 174/194 (89%) |
| | | <i>Alosa alosa</i> | AP009131 | 16,698 | 12/06/07 | 174/194 (89%) |
| | | <i>Alosa sapidissima</i> | DQ912045 | 582 | 11/06/07 | 174/194 (89%) |
| | | | | | | |

Se determinaron las relaciones filogenéticas de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes COI y 12S de *S. meleagris*, utilizando los criterios de vecino más cercano (Neighbor Joining, NJ, por sus siglas en inglés) (Soitou y Nei, 1987), máxima parsimonia (Maximum Parsimony, MP, por sus siglas en inglés) (Swofford, 2000) y máxima verosimilitud (Maximum Likelihood, ML, por sus siglas en inglés) (Aldrich, 1997). Estos análisis se realizaron en PAUP 4.0 (Swofford, 2000) utilizando grupos externos para comparar las relaciones y utilizando bootstrap para los tres criterios.

En los árboles para el gen COI se analizaron un total de 682 pb, utilizándose como grupos externos ReEU373724, *Rophilema esculentum* (medusa); AaAY903210, *Aurelia aurita* (medusa); PsFJ423978, *Porites solida* (coral) y como grupo externo al filo PpGU945497, *Phytophthora pseudotsugae* (hongo).

Los árboles muestran que para este gen no hay una asociación por fenotipos ya que estos se encuentran mezclados, por lo cual no es distinguible un patrón (Fig. 17, 18 y 19).

En el caso del gen 12S, se utilizaron como grupos externos AvNC010769, *Aphrocallistes vastus* (esponja) y HpFJ489415, *Hormathia pectinata* (anémona). Los árboles, al igual que el gen COI, no presentan patrones definidos ni por grupos independientes de muestras ni por fenotipos (Fig. 20, 21 y 22).

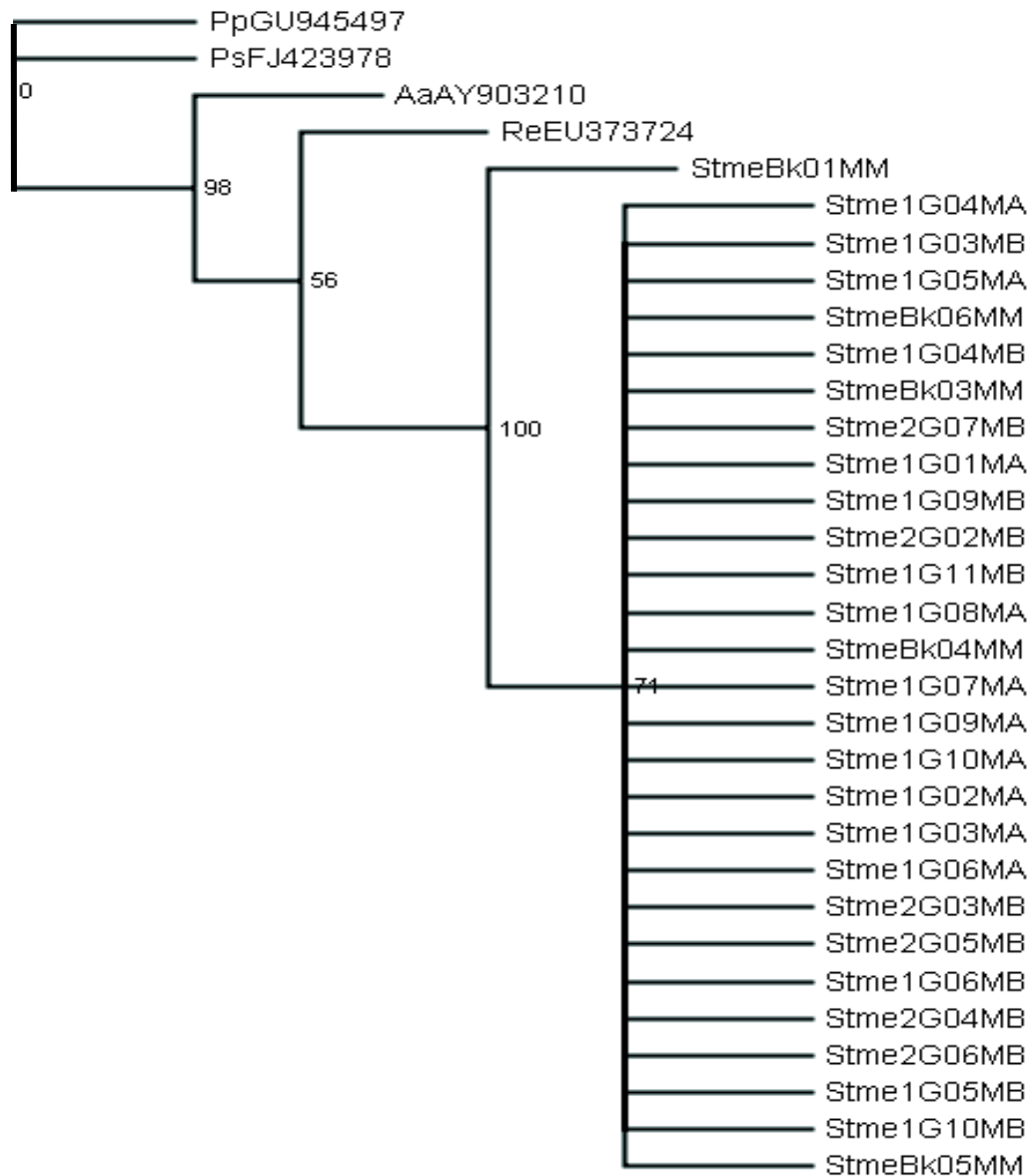


Figura 17 Árbol consenso estricto de vecino más cercano (NJ) para gen COI (100 árboles), basado en 682 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. ReEU373724, *Rophilema esculentum*. AaAY903210, *Aurelia aurita*. PsFJ423978, *Porites solida*. PpGU945497, *Phytophthora pseudotsugae*. Stme, *Stomolophus meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado

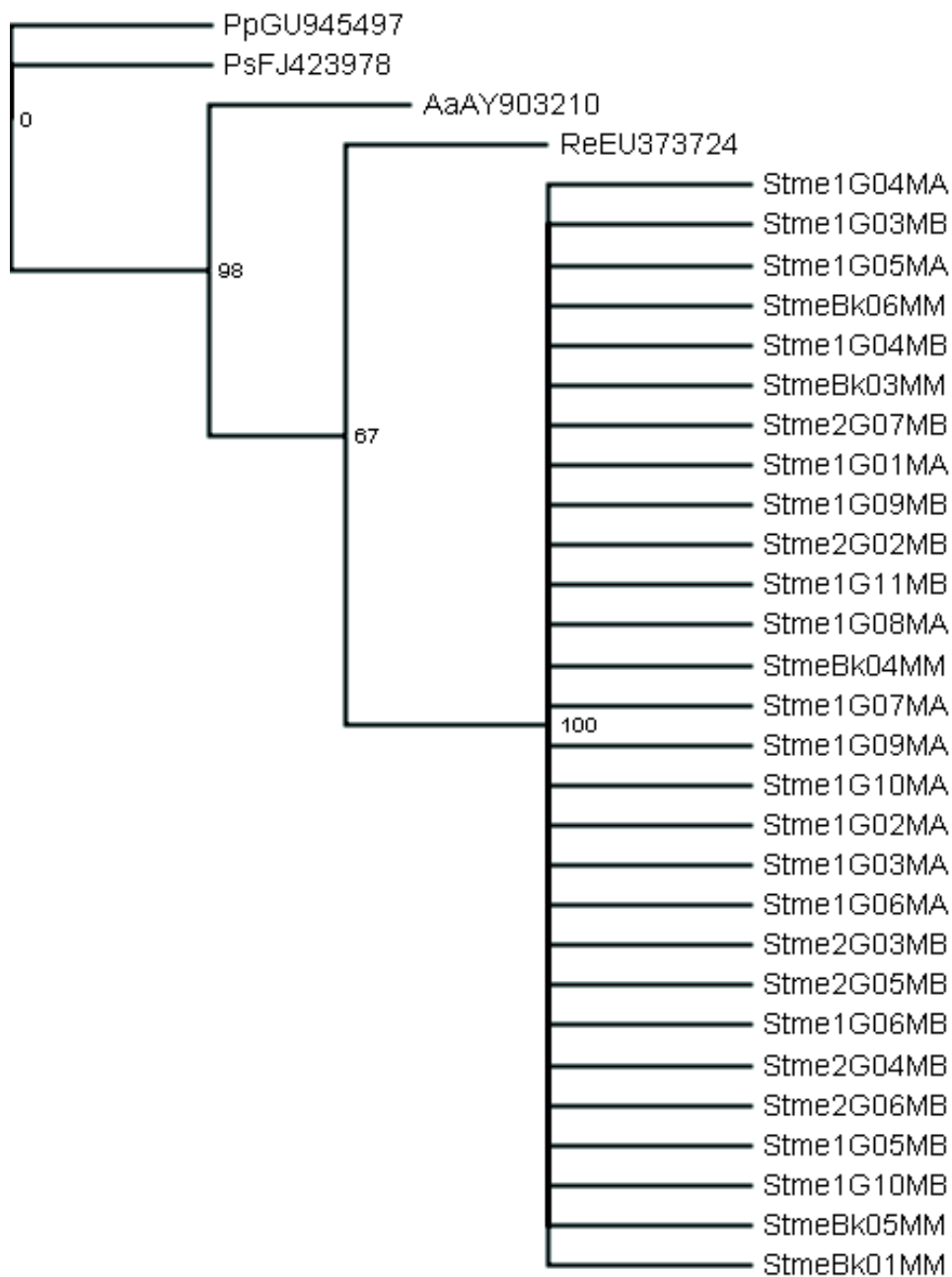


Figura. 18. Árbol consenso estricto de máxima parsimonia (MP) para gen COI (100 árboles), basado en 682 pb (132 sitios informativos para parsimonia). Longitud= 442; Índice de Consistencia (CI) = 0.855; Índice de Retención (RI)= 0.688; Índice de Consistencia Reescalado (RC)= 0.588. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. ReEU373724, *R. esculentum*. AaAY903210, *A. aurita*. PsFJ423978, *P. solida*. PpGU945497, *Ph. pseudotsugae*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.

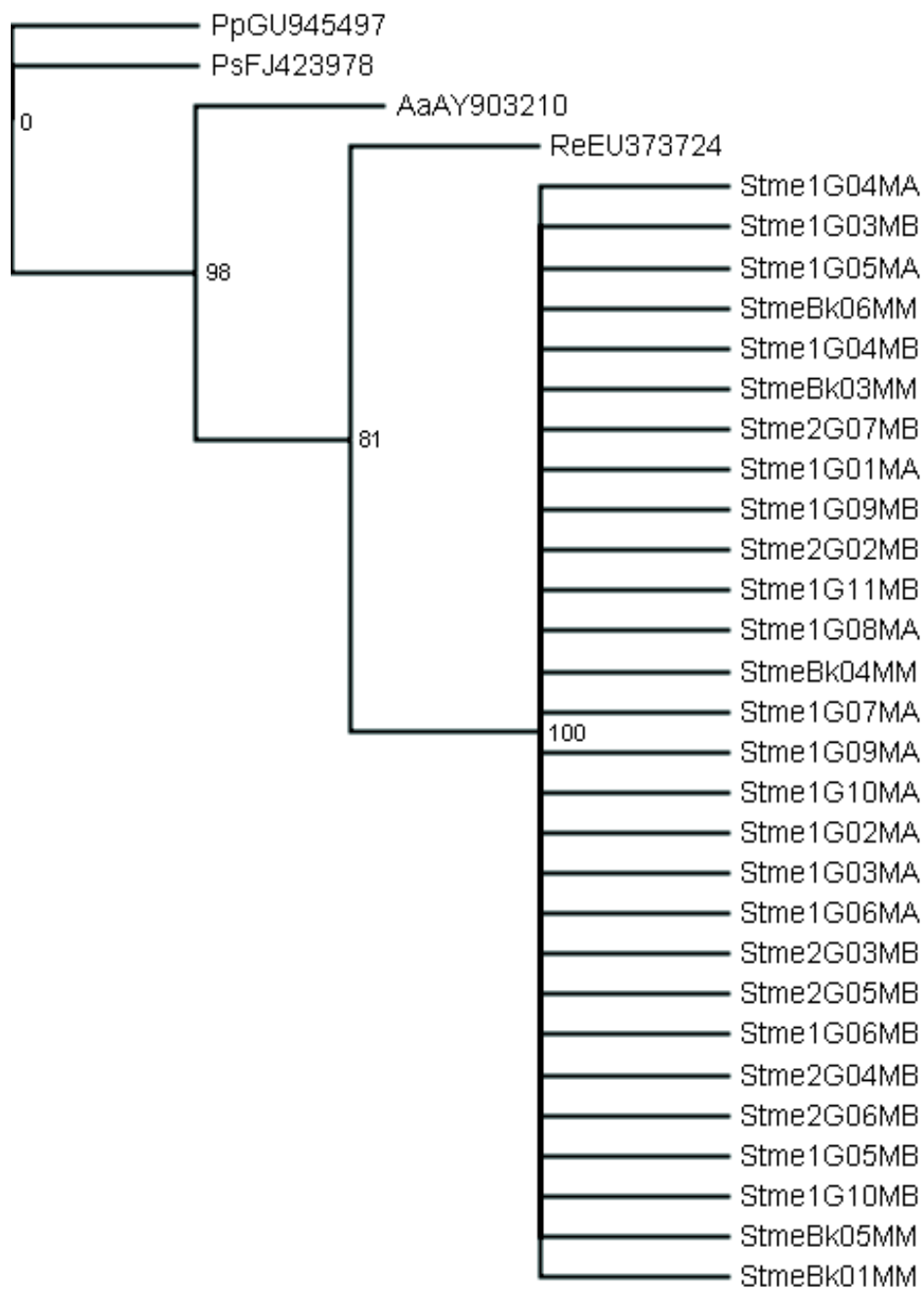


Figura. 19. Árbol consenso estricto de máxima verosimilitud (ML) para gen COI (100 árboles), basado en 682 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. ReEU373724, *R. esculentum*. AaAY903210, *A. aurita*. PsFJ423978, *P. solida*. PpGU945497, *Ph. pseudotsugae*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado

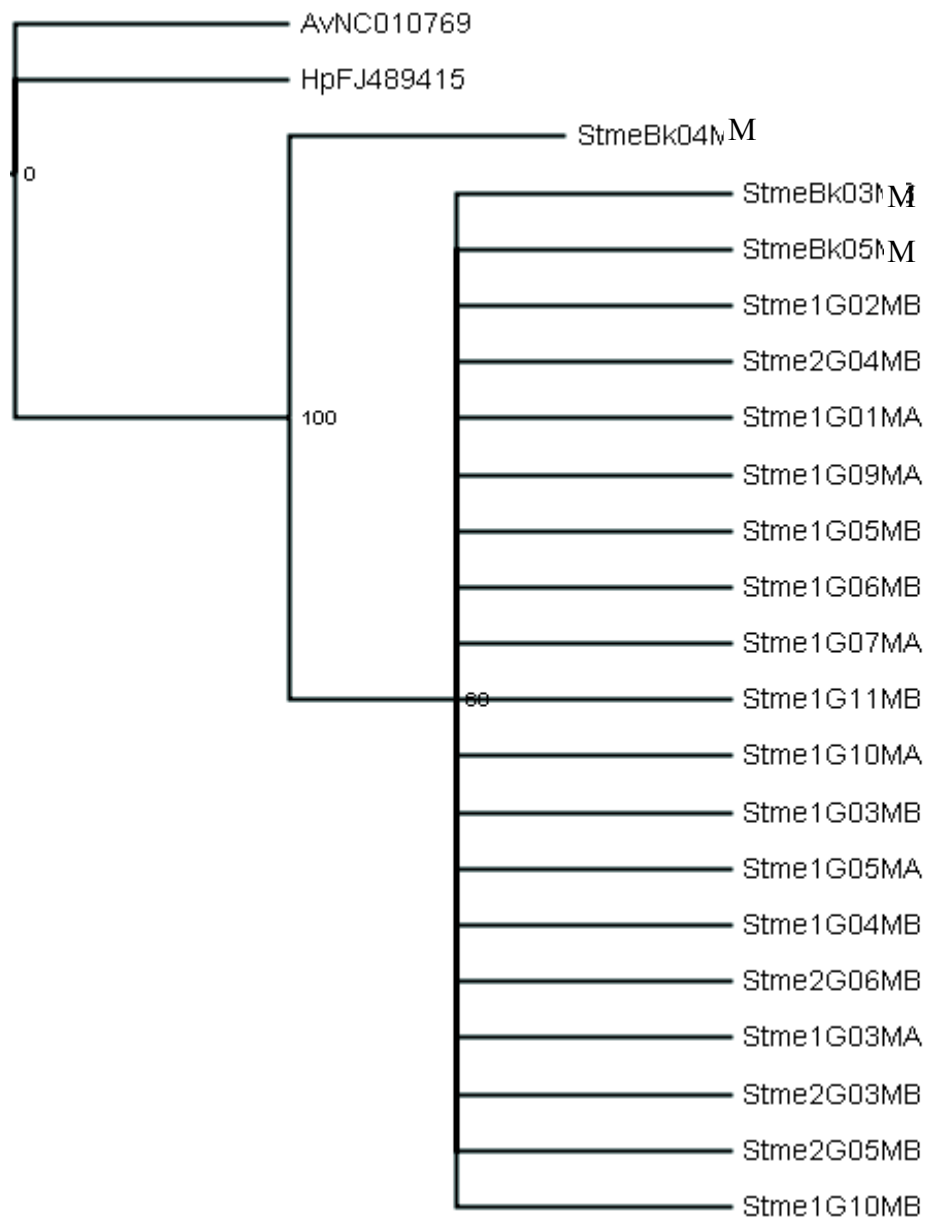


Figura. 20. Árbol consenso estricto de vecino más cercano (NJ) para gen 12S (100 árboles), basado en 925 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. AvNC010769, *Aphrocallistes vastus*. HpFJ489415, *Hormathia pectinata*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado

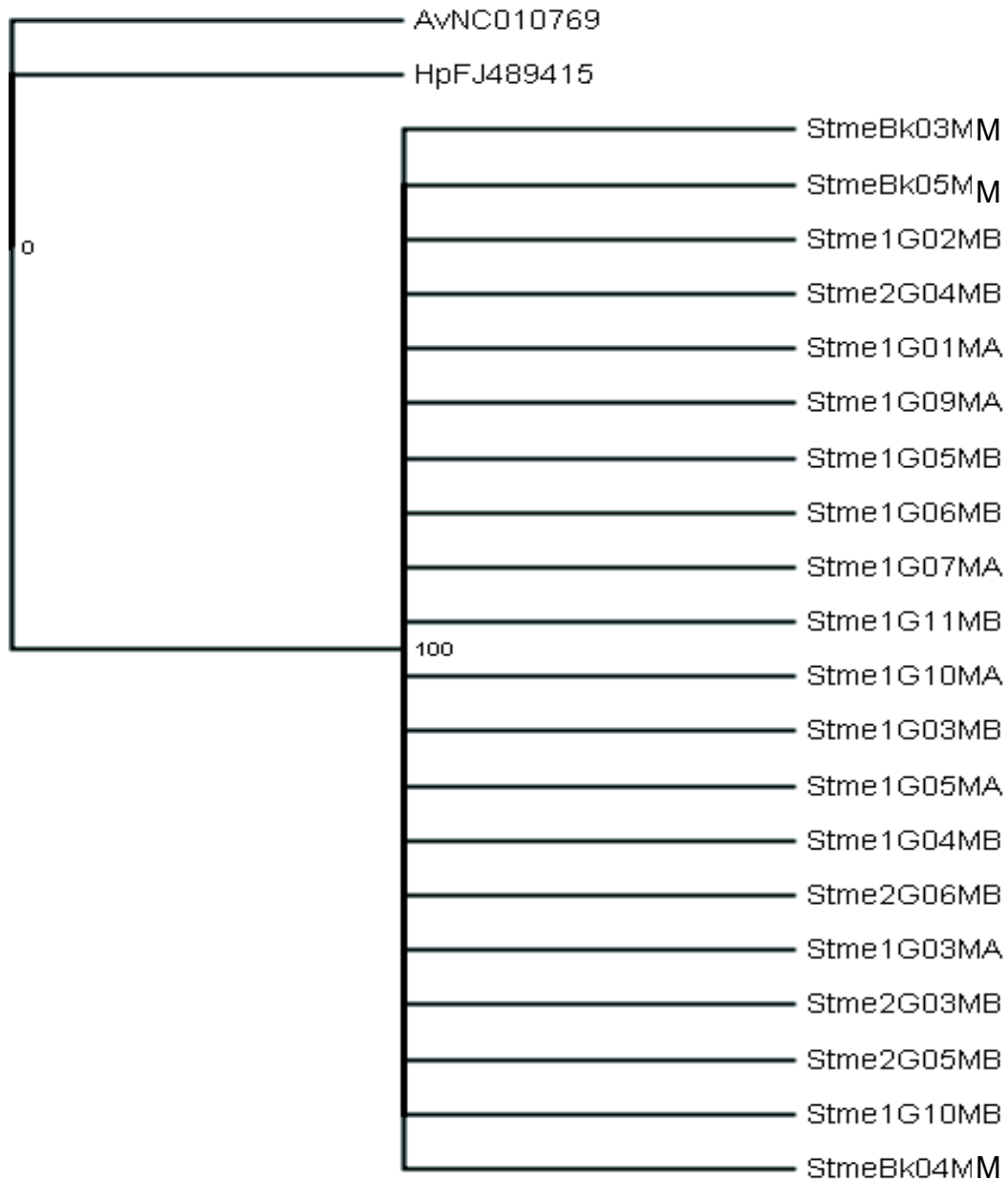


Figura. 21. Árbol consenso estricto de máxima parsimonia (MP) para gen 12S (100 árboles), basado en 925 pb (53 sitios informativos para parsimonia). Longitud= 650; Índice de Consistencia (CI) = 0.914; Índice de Retención (RI)= 0.559; Índice de Consistencia Reescalado (RC)= 0.511. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. AvNC010769, *Ap. vastus*. HpFJ489415, *H. pectinata*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado

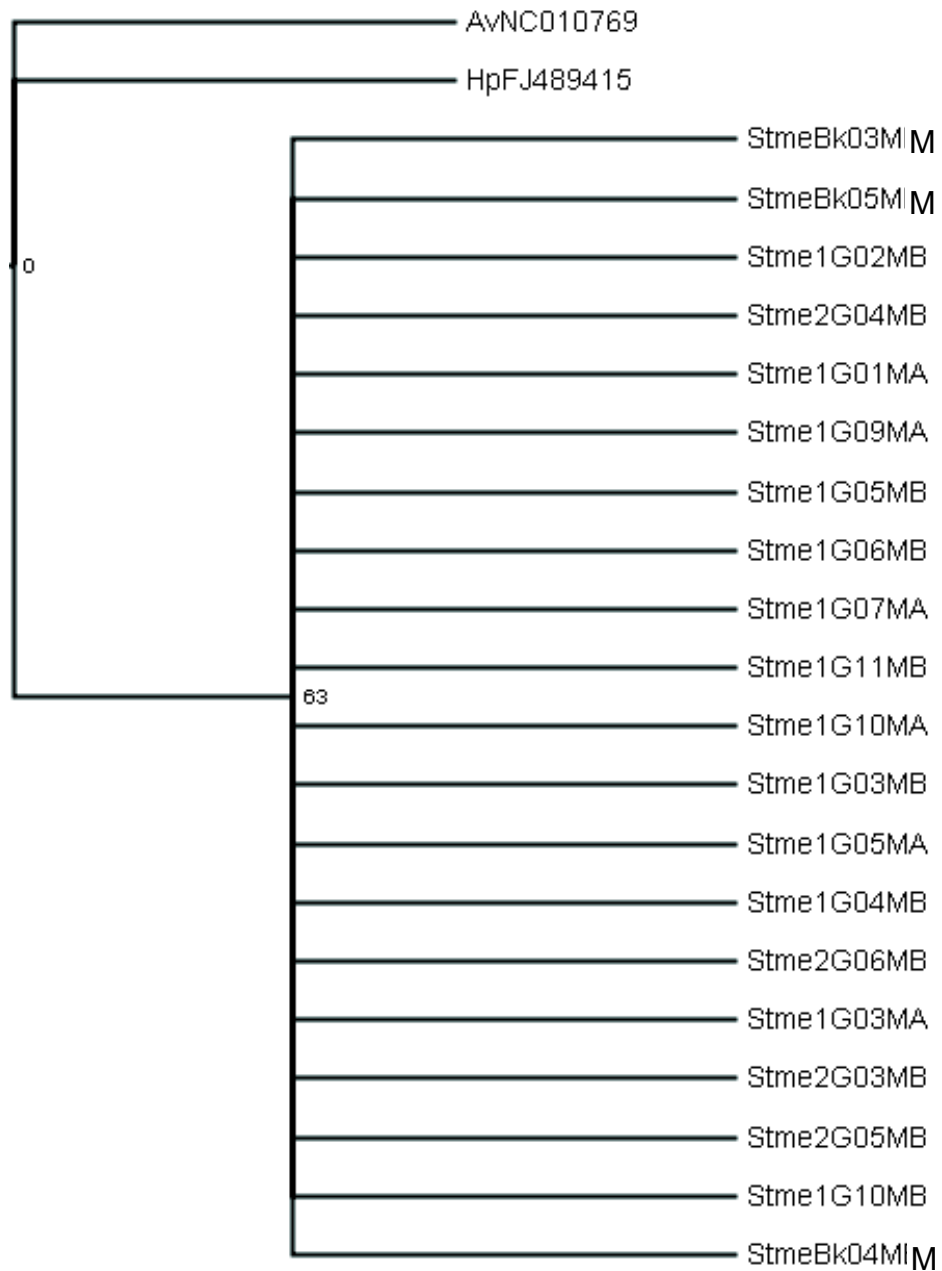


Figura. 22. Árbol consenso estricto de máxima verosimilitud (ML) para gen 12S (100 árboles), basado en 925 pb. Los valores de los nodos representan los porcentajes de 100 repeticiones bootstrap. AvNC010769, *Ap. vastus*. HpFJ489415, *H. pectinata*. Stme, *S. meleagris*. MA, fenotipo azul. MB, fenotipo blanco. MM, fenotipo morado.

La topología de los árboles en los tres criterios y para los dos genes estudiados presenta una consistencia en la formación de un clado único para *S. meleagris*.

En el gen COI, las especies de medusas externas *R. esculentum* y *A. aurita* se asocian a partir de este clado único, lo cuál ya había sido reportado por Collins (2002) en un estudio sobre filogenia de cnidarios.

VI.4. Diversidad Genética y Estructura Genética

Con las secuencias obtenidas de 750 nt (± 20) del gen COI, editadas y ajustadas a una longitud estándar de 635 pb, se observaron 608 *loci* (posiciones o nucleótidos) conservados y 27 polimórficos, 4 fueron catalogados como genéticamente informativos (inteles).

Las secuencias obtenidas y analizadas del gen 12S, fueron de 195 nucleótidos, encontrándose 137 *loci* conservados y 58 polimórficos, 23 fueron inteles (Tabla IX).

Al analizar los datos obtenidos en la distribución de frecuencias haplotípicas, para el gen COI (Tabla X), se observan 10 haplotipos en la población “Sonora”, de los que el 1 y el 2 son los que presentaron las frecuencias más altas debido a su representatividad dentro de cada fenotipo y entre los tres fenotipos (filas). El fenotipo azul presento 3 haplotipos, el fenotipo blanco 7 y el fenotipo morado 4.

En el análisis de las secuencias del gen 12S (Tabla XI) encontramos 20 haplotipos, observándose que cada uno de ellos corresponden a uno individuo, no

compartiéndose ni entre individuos ni entre fenotipos o grupos de individuos por fenotipos.

Tabla IX. Análisis general de secuencias de los genes COI y 12S de *S. meleagris*.

| Variable | COI | | | | 12S | | | |
|------------------------|------|------|-----|-------|-----|------|-----|-------|
| | Az | Bc | Mr | Total | Az | Bc | Mr | Total |
| Fenotipo (muestras) | (10) | (13) | (5) | (28) | (6) | (10) | (4) | (20) |
| No. Nucleótidos | 635 | 635 | 635 | 635 | 195 | 195 | 195 | 195 |
| Conservados | 630 | 629 | 614 | 608 | 171 | 154 | 176 | 137 |
| Variables | 5 | 6 | 21 | 27 | 24 | 41 | 28 | 58 |
| Sitios informativos | 1 | 2 | 1 | 4 | 11 | 15 | 7 | 23 |
| Cambios simples | 4 | 4 | 20 | 23 | 13 | 26 | 21 | 35 |

Tabla X. Distribución de frecuencias haplotípicas encontradas para el gen COI de *S. meleagris* (nota: Entre paréntesis se presentan las frecuencias absoluta y relativa de cada haplotipo).

| No | Freq. | s.d. | Fenotipo (número de muestras) | | |
|----|--------|--------|---|---|-----------------------------------|
| | | | Azul (10) | Blanco (13) | Morado (5) |
| 1 | 0.2857 | 0.0869 | G-01MACOI, G-05MACOI (2/0.2) | G-04MBCOI, G-09MBCOI, G2-02MBCOI, G2-07MBCOI (4/0.308) | Bk-03MBCOI, Bk-06MBCOI (2/0.4) |
| 2 | 0.3571 | 0.0922 | G-02MACOI, G-03MACOI, G-06MACOI, G-07MACOI, G-08MACOI, G-09MACOI, G-10MACOI, (7/0.7) | G2-05MBCOI, G2-03MBCOI (2/0.157) | Bk-04MBCOI (1/0.2) |
| 3 | 0.0357 | 0.0357 | G-04MACOI (1/0.1) | 0 | 0 |
| 4 | 0.0357 | 0.0357 | 0 | G-03MBCOI (1-0.076) | 0 |
| 5 | 0.1071 | 0.0595 | 0 | G-05MBCOI, G-06MBCOI, G2-06MBCOI (3/0.231) | 0 |
| 6 | 0.0357 | 0.0357 | 0 | G-10MBCOI (1/0.076) | 0 |
| 7 | 0.0357 | 0.0357 | 0 | G-11MBCOI (1/0.076) | 0 |
| 8 | 0.0357 | 0.0357 | 0 | G2-04MBCOI (1/0.076) | 0 |
| 9 | 0.0357 | 0.0357 | 0 | 0 | Bk-01MBCOI (1/0.2) |
| 10 | 0.0357 | 0.0357 | 0 | 0 | Bk-05MBCOI (1/0.2) |

Tabla XI. Distribución de frecuencias haplotípicas encontradas para el gen 12s de *S. meleagris* (nota: Entre paréntesis se presentan las frecuencias absoluta y relativa de cada haplotipo)

| No. | Freq. | s.d. | Fenotipo (número de muestras) | | |
|-----|-------|------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | | | Azul (6) | Blanca (10) | Morada (4) |
| 1 | 1 | 0.00 | G-01MA12 (1/0.167) | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 0.00 | G-03MA12 (1/0.167) | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 0.00 | G-05MA12 (1/0.167) | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 0.00 | G-07MA12 (1/0.167) | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 0.00 | G-09MA12 (1/0.167) | 0 | 0 |
| 6 | 1 | 0.00 | G-10MA12 (1/0.167) | 0 | 0 |
| 7 | 1 | 0.00 | 0 | G-03MB12 (1/0.1) | 0 |
| 8 | 1 | 0.00 | 0 | G-04MB12 (1/0.1) | 0 |
| 9 | 1 | 0.00 | 0 | G-05MB12 (1/0.1) | 0 |
| 10 | 1 | 0.00 | 0 | G-06MB12 (1/0.1) | 0 |
| 11 | 1 | 0.00 | 0 | G-10MB12 (1/0.1) | 0 |
| 12 | 1 | 0.00 | 0 | G-11MB12 (1/0.1) | 0 |
| 13 | 1 | 0.00 | 0 | G2-03MB12 (1/0.1) | 0 |
| 14 | 1 | 0.00 | 0 | G2-04MB12 (1/0.1) | 0 |
| 15 | 1 | 0.00 | 0 | G2-05MB12 (1/0.1) | 0 |
| 16 | 1 | 0.00 | 0 | G2-06MB12 (1/0.1) | 0 |
| 17 | 1 | 0.00 | 0 | 0 | Bk-02MB12 (1/0.25) |
| 18 | 1 | 0.00 | 0 | 0 | Bk-03MB12 (1/0.25) |
| 19 | 1 | 0.00 | 0 | 0 | Bk-04MB12 (1/0.25) |
| 20 | 1 | 0.00 | 0 | 0 | Bk-05MB12 (1/0.25) |

Para la determinación de la estructura genética, se realizó un análisis AMOVA (Weir y Cockerham, 1984; Excoffier *et al.*, 1992; Weir, 1996), los valores obtenidos de FST (índice de fijación) en las secuencias del gen COI se observan en un rango de 0.05 a 0.15, representando un nivel moderado de diferenciación genética según lo reportado por Hartl y Clark (2008). Sin embargo, al realizar la prueba exacta de diferenciación de muestras basada en haplotipos (Raymond y Rousset, 1995; Goudet *et al.*, 1996), se obtuvo un valor exacto de no diferenciación de $P = 1.000 \pm 0.00$, tanto en el análisis global (población “Sonora”) como en la comparación por pares de muestras (fenotipos), con 30,000 pasos Markov, no existiendo diferencias significativas ($p = 0.05$) (Tabla XII).

Para el análisis del gen 12S, de acuerdo al análisis AMOVA (Weir y Cockerham, 1984; Excoffier *et al.*, 1992; Weir, 1996) los valores de FST obtenidos se encuentran en el rango de 0.0 a 0.05, lo que se evidencia un bajo nivel de diferenciación genética (Hartl y Clark, 2008) en la población “Sonora” y entre los diferentes fenotipos de *S. meleagris*. Sin embargo, al realizar la prueba exacta de diferenciación de muestras basada en los haplotipos (Raymond y Rousset, 1995; Goudet *et al.*, 1996), se obtuvo un valor exacto de no diferenciación de $P = 1.000 \pm 0.00$ tanto en el análisis global (población “Sonora”) como para la comparación por pares de muestras (fenotipos), con 30,000 pasos Markov, no existiendo diferencias significativas ($p = 0.05$) (tabla XIII).

Tabla XII. Análisis AMOVA del gen COI de *S. meleagris*. (*) Prueba de significancia (1,023 permutaciones). Va y FST : P(rand. value > obs. value) = 0.0146. P (rand. value = obs. value) = 0.0000. P-value = 0.0146±0.0036

| Fuente de variación | g.l. | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación | Índices FST específicos | |
|---|------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|
| | | | | | Población (nombre) | FST |
| Entre poblaciones (azul, blanca y morada) | 2 | 5.60 | 0.1708 Va | 11.71 | 1 (azul) | 0.1726 |
| En la población “Sonora” | 25 | 32.40 | 1.2960 Vb | 88.29 | 2 (blanca) | 0.1509 |
| Total | 27 | 38.00 | 1.4678 | | 3 (morada) | -0.0819 |
| Índice de fijación | FST: | 0.1171 | | | | |

Tabla XIII. Análisis AMOVA del gen 12S de *S. meleagris*. (*) Prueba de significancia (1,023 permutaciones). Va y FST : P(rand. value > obs. value) = 0.29619. P(rand. value = obs. value) = 0.00489. P-value = 0.30108±-0.0099

| | | | | | Índices FST específicos* | |
|---|------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------|
| Fuente de variación | g.l. | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación | Población (nombre) | FST |
| Entre poblaciones (azul, blanca y morada) | 2 | 13.00 | 0.0754 Va | 1.23 | 1 (azul) | 0.0318 |
| En la población "Sonora" | 17 | 102.55 | 6.0323 Vb | 98.77 | 2 (blanca) | 0.0076 |
| Total | 19 | 115.55 | 6.1077 | | 3 (morada) | -0.0050 |
| Índice de fijación | FST: | 0.0123 | | | | |

VI.5. Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Para los análisis PCR-RFLP se utilizaron los amplicones de ITS1 de 1,339 pb (Tabla III) derivados del uso de los cebadores ITS SSU 1400F- LSU DICR, específicos para la región SSU-ITS-LSU de organismos eucariotas, ya que los fragmentos de menor tamaño ($\geq 1,000$ pb, Tabla III) no reunían las condiciones requeridas para proporcionar la resolución deseada.

Al realizar las pruebas con las 16 enzimas propuestas para el análisis (Tabla V, Fig. 19), y de acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron 7 enzimas (*AluI*, *Hinf* II, *Hinc* I, *Bam* HI, *Aci* I, *Nde* I, *Pst* I) ya que presentaron productos de digestión y patrones de bandeo definidos y analizables (Fig. 23). Una vez seleccionadas las enzimas, se amplificaron un total de 34 muestras de la región SSU-ITS-LSU, distribuida entre los diferentes fenotipos y localidades; en la mayoría de los casos se obtuvieron productos de digestión y, por lo tanto, patrones de restricción.

En general, los resultados de la digestión enzimática de los amplicones generaron tres tipos de resultados, que pueden resumirse en diversos patrones de bandeo, que no se asocian ni al fenotipo ni a la localidad de colecta, patrones de bandeo idénticos entre los diferentes fenotipos y las diferentes localidad de colecta, ó no hubo generación de productos de digestión.

Dentro del primer caso, múltiples patrones de bandeo no asociados al fenotipo ni a la localidad (por ejemplo, Fig. 24), se pueden agrupar las enzimas *Nde* I, *Alu* I, *Aci* I (datos no mostrados) y *Hinf* I.

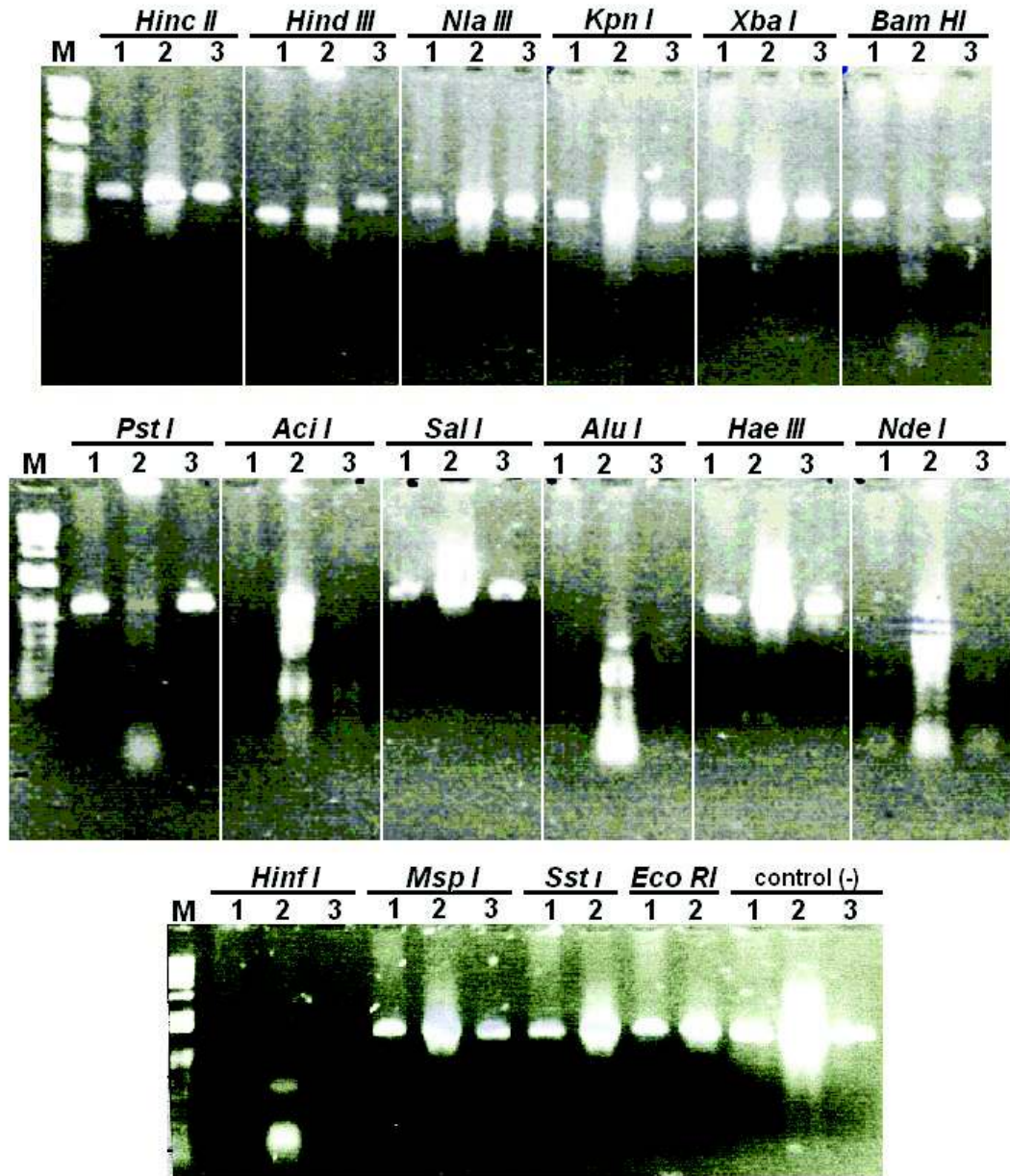


Figura 23. Análisis electroforético en geles de agarosa-TBE al 2% de perfiles de restricción de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos (1-3) de *S. meleagris*. Líneas: 1, fenotipo azul; 2, fenotipo blanco y 3, fenotipo morado. Técnica de tinción EtBr.

Dentro del segundo caso, patrones de bandeo idénticos entre fenotipos y localidades, se encuentran los productos de digestión generados por *Pst* I (Fig. 25). Finalmente dentro del tercer caso, no se observaron productos de digestión, se pueden incluir a las enzimas *Hind* III (datos no mostrados) y *Bam* HI (Fig. 26).

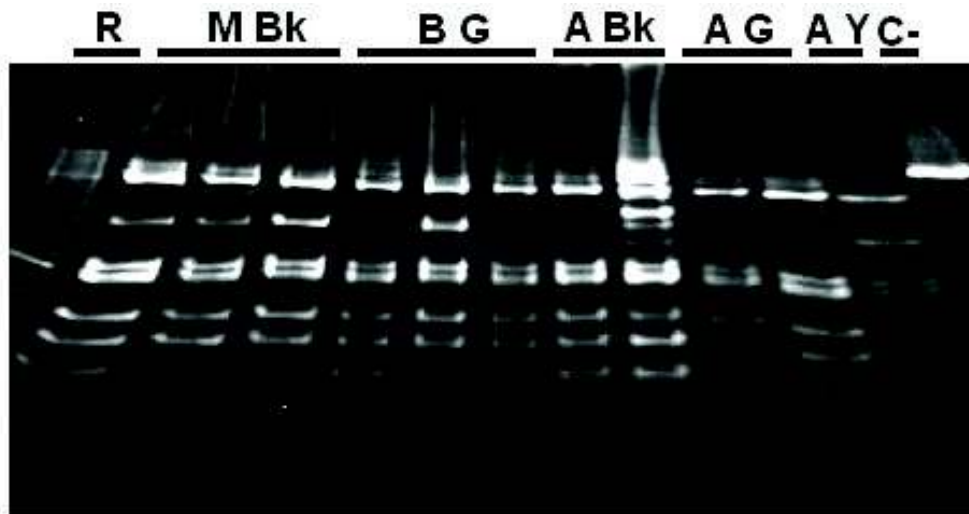


Figura 24. Patrones electroforéticos de restricción con *Hinf* I de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos y localidades de colecta de *S. meleagris*, resueltos en geles de TBE-poliacrilamida al 15%. Notación: R, marcador de peso molecular 20 pb DNA ladder (Invitrogen); M, fenotipo morado; B, fenotipo blanco; A, fenotipo azul; Y, Yávaros; G, Guásimas, y Bk, Bahía Kino; C-, control negativo. Técnica de Tinción: de SYBR Gold (Invitrogen).

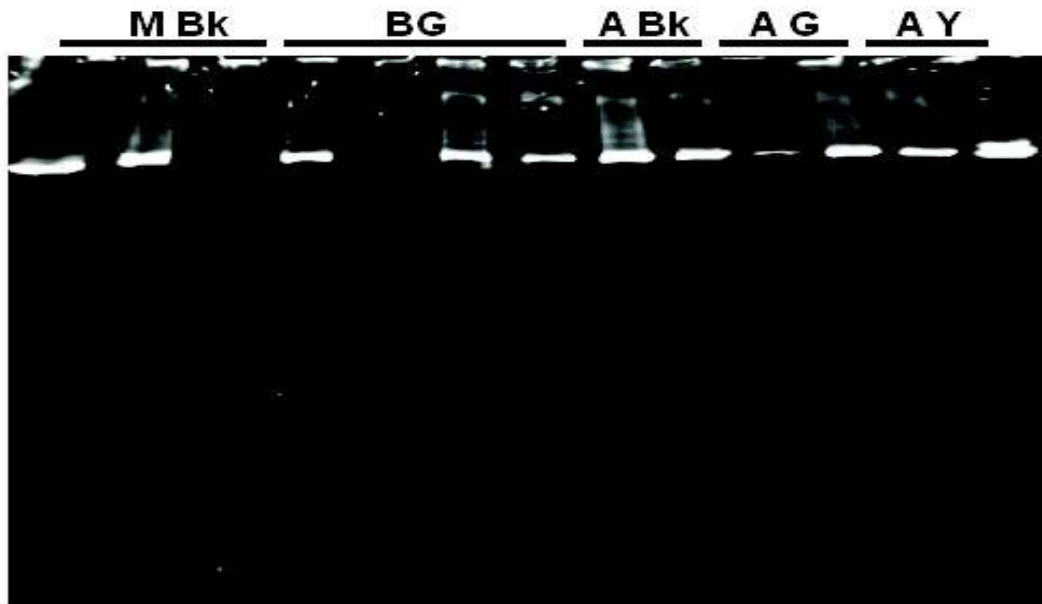


Figura 25. Patrones electroforéticos de restricción con *Pst* I de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos y localidades de colecta de *S. meleagris*, resueltos en geles de TBE-poliacrilamida al 15%. Notación: M, fenotipo morado; B, fenotipo blanco; A, fenotipo azul; Y, Yávaros; G, Guásimas, y Bk, Bahía Kino. Técnica de Tinción: de SYBR Gold (Invitrogen).

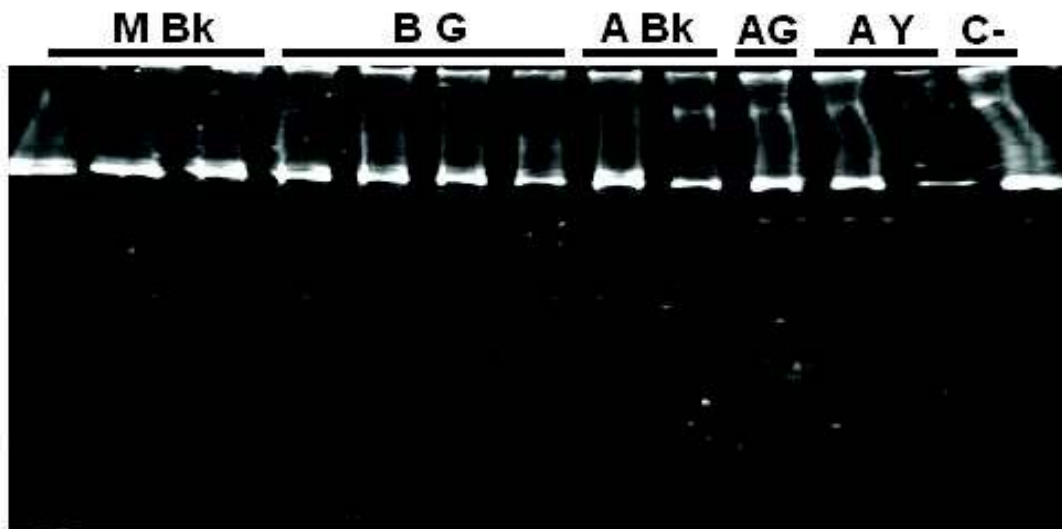


Figura 26. Patrones electroforéticos de restricción con *Bam* HI de amplicones ITS1 de 1,339 pb de los diferentes fenotipos y localidades de colecta de *S. meleagris*, resueltos en geles de TBE-poliacrilamida al 15%. Notación: M, fenotipo morado; B, fenotipo blanco; A, fenotipo azul; Y, Yávaros; G, Guásimas, y Bk, Bahía Kino; C-, control negativo. Técnica de Tinción: de SYBR Gold (Invitrogen).

VI.6. Análisis de Correlación

El análisis de correlación entre los datos de parámetros fisicoquímicos (temperatura ambiente y superficial de agua, salinidad y oxígeno disuelto), productividad primaria (clorofilas) y nutrientes (fosfatos, nitratos y nitritos) y las distribución de *S. meleagris*, reveló que la temperatura afecta la presencia de medusas, encontrándose ambos fenotipos (blanco y azul) en un intervalo de 20 a 26°C (como ha sido previamente reportado); sin embargo, la presencia del fenotipo blanco se correlacionó con los registros más bajos de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). El fenotipo azul fue más abundante en el mes de abril, contrario a lo observado para el fenotipo blanco (Fig. 27a). En relación a los otros parámetros analizados, no se observó un patrón de fluctuación de la salinidad ni el oxígeno disuelto a través del tiempo, observándose valores promedio de 36.39 ppt y 5.29 mg/L, respectivamente (datos no mostrados).

Considerando la productividad primaria, los blooms se observaron cuando se presentaron los valores más bajos (Fig. 27b), mientras que la presencia de medusas se correlaciono directamente con un incremento súbito en las concentraciones de nitratos y fosfatos (Fig. 27c).

Cabe resaltar que no hay registros de datos fisicoquímicos ni de nutrientes en la distribución del fenotipo morado, ya que no se encontró en la temporada normal de aparición de medusa en el área de Bahía de Kino (Sonora), por lo anterior no se pudieron realizar las correlaciones referentes a este fenotipo.

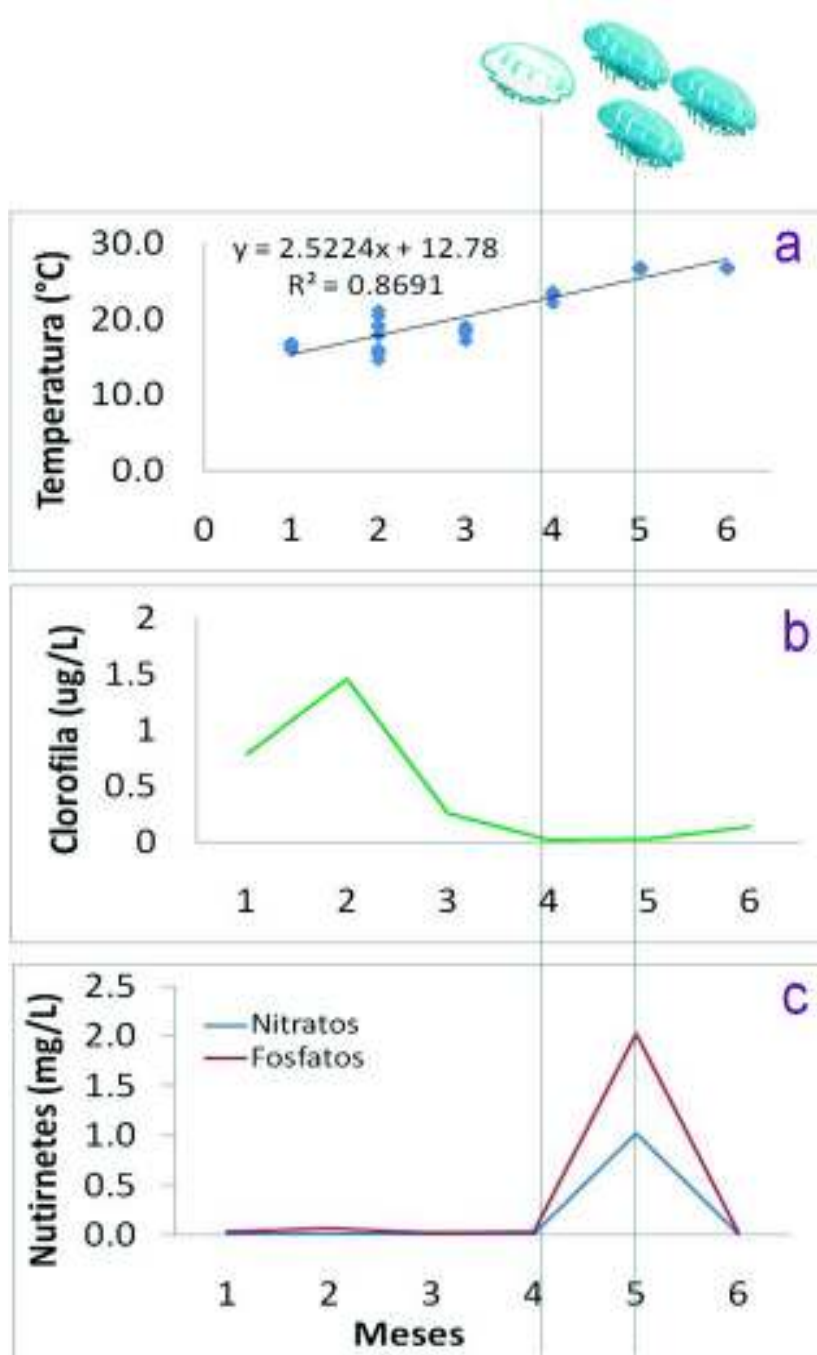


Figura 27. Representación grafica de la relación entre la presencia en Las Guásimas, Sonora (2008) de *S. meleagris* fenotipo blanco y azul y la temperatura (a), productividad primaria (b) y nutrientes (c) a través del tiempo (eje X = meses).

VII. DISCUSIÓN

Con los análisis de relaciones filogenéticas y estructura genética en las secuencias de los genes COI y 12S, se pudo determinar que los tres fenotipos de *S. meleagris* (azul, blanco y morado) corresponden a la misma especie. Así mismo, los árboles filogenéticos no presentaron patrones de agrupamiento relacionados con un fenotipo ni localidad. El análisis de AMOVA, aunque detectó diferenciación genética en la población “Sonora” con el gen COI, esta no puede atribuirse a un solo fenotipo en específico.

Al estimar la diversidad genética de *S. meleagris* en Las Guásimas y Bahía de Kino, Sonora se evidenció el bajo polimorfismo del gen COI ya que solo se detectaron 27 sitios variables (de 635 pb), 4 de los cuales son genéticamente informativos, caso contrario el gen 12S resultó ser altamente polimórfico presentando 58 sitios variables (de 195 pb), 15 de ellos genéticamente informativos. El mismo comportamiento se observó en el número de haplotipos para cada gen presentes en la población “Sonora”, por lo cual la alta variabilidad no se asocia a ningún patrón de distribución o agrupamiento.

En la determinación de estructura genética en la distribución de *S. meleagris* en la población “Sonora”, en COI se observó un nivel moderado de diferenciación genética ($F_{ST} \geq 0.15$) y en 12S se observó un nivel bajo de diferenciación genética ($F_{ST} \geq 0.05$), sin embargo al realizar la prueba exacta de diferenciación de muestras basada en haplotipos, el resultado en ambos genes determinó que no existe estructura genética, por

lo que los fenotipos observados tanto en Las Guásimas como en Bahía de Kino, corresponden a una sola población. Este resultado coincide con la descripción dada para la especie en el portal Marine Species Identification (<http://species-identification.org/index.php>), donde hacen referencia a los patrones de coloración de la superficie de campana que van desde azul hasta café, pasando por crema o amarillo, e incluso se han reportado organismos de color lavanda, lila o morado.

Sin embargo, se puede considerar que el gen COI no aporta suficiente información, ya que en otros estudios sobre poríferos y cnidarios (anthozoa, hydrozoa y scyphozoa) resultó que este gen tiene una lenta evolución (Huang, 2008; Sinniger *et al.*, 2008) encontrando que entre las especies estudiadas (*Montrastera annularis*, *M. faveolata* y *M. franksi*), no se establece diferencia a nivel genético. Los autores concluyen que la resolución del gen depende del linaje de cada grupo. Además, se ha encontrado que en otros invertebrados, la divergencia evolutiva en cnidarios es muy baja, por lo que el gen COI podría ser un marcador genético poco efectivo para estudiar la dispersión de poblaciones de octocorales o algunos otros cnidarios (France y Hoover, 2002).

Considerando que se utilizó el gen COI para diferenciación de especie, no podemos olvidar que también se utilizó el gen 12S, aunque este presentó una mayor variación, los resultados de diferenciación fueron los mismos que los obtenidos con el gen COI.

De la misma manera los análisis de RFLP muestran que aunque existe patrón de bandeo, este no se puede asociar a una estructura poblacional por fenotipo, sino a una variabilidad intra-específica de la misma población.

Los resultados de este trabajo podrían ser la respuesta a la variabilidad dentro de poblaciones naturales donde los medios nunca son uniformes, lo cual da como consecuencia que los organismos estén sometidos a acciones selectivas que difieren de un punto a otro de un hábitat y por ello se presentan diferencias fenotípicas entre los individuos (Franco *et al.*, 1991). Esto genera que la diversidad fenotípica dependa de la misma biología de la especie y del área de distribución en la que se encuentra. En este caso, no hay una diferenciación genética considerable como para definir a los diferentes fenotipos como especies diferentes.

De igual manera *S. meleagris* puede ser un ejemplo más de plasticidad fenotípica (en lo que respecta a consistencia, coloración y patrones de pigmentación). Aunque en el caso del fenotipo morado, se añade a la coloración, una diferenciación a nivel de gametos, hembras con morfología de ovocitos diferente en tamaño y forma, así como ovocitos en reabsorción y abundantes trofocitos. En el caso de los machos, la mayor diferencia se observó en la forma de la cabeza de los espermatozoos y la forma de los tubos espermáticos comparándola con las otras coloraciones (blanca y azul) y otras temporadas (Rodríguez y Meza, 2009). Sin embargo, ya que el significado de plasticidad fenotípica se refiere a la habilidad de un genotipo de producir más de una forma alternativa de morfología, estado fisiológico, y/o comportamiento en respuesta a las condiciones ambientales (West-Eberhard, 1989), en este trabajo este término podría

explicar las variaciones de colores, ya que en algunos crustáceos del género *Xantho* se ha encontrado variaciones de colores como mecanismo de camuflaje o mimetismo en pastos marinos (Reuschel y Schubart, 2007).

En el caso de cnidarios, existen estudios de respuesta adaptativa en anthozoos para facilitar su movimiento y adaptación a diferentes hábitat (Prada *et al.*, 2008). Sin embargo señalan la importancia de definir correctamente a las especies, ya que se puede sobre estimar su distribución, abundancia y tolerancia fisiológica. En el caso de las medusas, la especie del género *Mastigas*, se considera muy variable en tamaño y coloración, generando confusión en su identificación. No obstante, Dawson (y Hammer, 2003; 2005) determina que estas variaciones se deben a plasticidad fenotípica por cambios en nivel del mar y por la topología del lago marino donde se encuentra la población estudiada. Además, pone en evidencia la dificultad sistemática y taxonómica a nivel de especie en algunos schyozoos, proponiendo la integración de los estudios morfológicos y moleculares para determinar especies crípticas o hermanas.

Las especies crípticas definidas como especies que son difíciles o imposibles de distinguir con características únicamente morfológicas (Mayr y Ashlock, 1993), es abordado en el caso de la medusa del género *Cassiopea* en las Islas de Hawaii (Holland *et al.*, 2004). En estos trabajos se considera que a pesar de estar descritas dos especies *C. medusa* y *C. mertensi*, se da un fenómeno de especiación alopática, a través de la que se generan otras especies que al ser tan parecidas con las ya descritas, no se han tomado en cuenta. Finalmente, en este trabajo se resalta la necesidad de emplear otros marcadores mtDNA más diversos y realizar una revisión global de la sistemática y taxonomía del

género, ya que algunos organismos no corresponden a las especies *C. medusa* y *C. mertensis*, ni a las reportadas en esa área, sino a otras que al ser tan parecidas morfológicamente con las medusas ya reportadas, se les consideró por los autores como especies crípticas, proponiendo el renombramiento y descripción de éstas.

Para *S. meleagris*, la utilización de otros marcadores moleculares que proporcionen mayor información, permitiría descartar o abordar este término para explicar las variaciones de colores que presenta la especie en su distribución.

Otra posibilidad para explicar nuestros resultados es considerar el término *clina*, definido como “la variación gradual de un carácter determinado”, considerando que para que se pueda dar esta variación contribuyen factores como el medio externo que varía de manera gradual, la selección natural que tiende a mantener los fenotipos que siguen gradientes ecológicos y geográficos, el flujo génico que tiende a aplomar todas las diferencias y la homeostasis que disimula las diferencias genéticas entre poblaciones con-específicas (Zamponi y Acuña, 1991).

Si consideramos que en otras costas de México, como Oaxaca o Tabasco, se han observado otros patrones fenotípicos de pigmentación (café) y tomando en cuenta los informes técnicos presentados que establecieron como factores ambientales potenciales que afectan la distribución de la especie a la temperatura y la precipitación pluvial (López y Álvarez, 2008), estos fenotipos serían la respuesta y expresión adaptativa a la diversidad de condiciones ecológicas. Sin embargo, en el caso de Las Guásimas y Bahía de Kino sería subjetivo considerar a las variaciones fisicoquímicas y de calidad del agua

como las variables determinantes de la condición ecológica que tiene como efecto las variaciones observadas en la coloración de *S. meleagris*.

A pesar de las dificultades tanto de la poca información genética acerca de la especie o una metodología específica para este tipo de organismos, se logro generar la información necesaria para poder seguir trabajando y dando respuesta a preguntas posteriores que surgieron al finalizar el análisis de los datos

Se recomienda seguir realizando investigación sobre esta especie, sobre todo en el caso del fenotipo morado, dadas las diferencias morfológicas e histológicas observadas en otros trabajos (Rodríguez y Meza, 2009). También se sugiere la colecta de una mayor cantidad de muestras de organismos del fenotipo morado para realizar los análisis, así como la utilización de otros marcadores moleculares para poder determinar si el fenotipo morado corresponde a una especie diferente o a la misma, aunque con los resultados presentados en este trabajo, también se puede considerar para este fenotipo la posibilidad de una subespecie, ya que el término corresponde a poblaciones de una especie que se diferencian por una o más características (Smith y Smith., 2007). Así mismo se recomienda la realización de un monitoreo de fisicoquímicos en la región de Bahía de Kino en las temporadas donde se presente la coloración morada para poder asociar con mayor precisión la relación genotipo-ambiente.

Además, la utilización de otros marcadores moleculares para comparar la efectividad del gen COI en la diferenciación genética a nivel de especie.

VIII. CONCLUSIONES

Se ha contrastado la hipótesis de esta tesis, determinando que las diferentes coloraciones que se observaron, son variaciones debidas a la plasticidad fenotípica de la especie sin asociarse con un factor ambiental específico.

Se obtuvieron secuencias parciales del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI), que para esta especie no había sido reportado. También se obtuvieron secuencias parciales del gen 12S, que para esta especie no había sido reportada en ninguna base de datos y cabe resaltar que para ninguna especie de medusa existen secuencias registradas para este gen, lo cual representa una aportación importante al estudio genético de las medusas en particular de *S. meleagris*.

Los análisis de relaciones filogenéticas permiten concluir que no existe una diferenciación evolutiva en los genes COI y 12S, considerando las diferentes coloraciones como una sola especie.

Los análisis de PCR-RFLP de la región ITS1 no presentaron patrones de bandeo asociados a fenotipo o localidad, concluyendo que además de ser una sola población, los fenotipos estudiados corresponden a la especie *S. meleagris*.

Los resultados de los análisis realizados en este trabajo concuerdan entre sí, lo que permite concluir que los fenotipos presentes en la costa central de Sonora corresponden a *S. meleagris* y son únicamente variaciones en la plasticidad fenotípica posiblemente como respuesta adaptativa al ambiente.

IX. LITERATURA CITADA

- Aldrich, J. 1997. R. A. Fisher and the Making of Maximum Likelihood 1912-22. *Statistical Science* 12:162-176.
- Álvarez, J.; López, R.; Torres, R. 2003. Estimaciones de abundancia de la medusa “bola de cañón” (*Stomolophus meleagris*) al sur de Sonora para el establecimiento de una pesquería sustentable. 2do. Informe Parcial. Pesquera México, S. A. de C. V. Guaymas, Sonora, México.
- Álvarez-Tello, F. 2007. Estimaciones de abundancia de la medusa “Bola de Cañón” (*Stomolophus meleagris*) al sur de Sonora, para el establecimiento de una pesquería sustentable. Informe Proyecto Integral. Guaymas, Sonora, México.
- Arlequin 3.11. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. y Struhl, K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition. John Wiley and Sons, Inc. 847pp.
- Barnes, R. y Ruppert, E. 1977. Zoología de los invertebrados. Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 1089pp.
- Berntson, E. A.; Bayer, F. M.; McArthur, A. G.; Frances, S. C. 2001. Phylogenetic relationship within the *Octocorallia* (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. *Marine Biology*, 138:235-246.
- Bigelow, H. 1914. Note on the medusan genus *Stomolophus* from San Diego. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 13:239-241.

- Blastn. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Caddy, J. y Griffiths, R. 1996. Los recursos marinos y su desarrollo sostenible. Perspectivas institucionales y medioambientales. *Food & Agriculture Organization*. 191pp.
- Calder, D. R. 1982. Life History Of the cannonball jellyfish, *Stomolophus meleagris* L. Agassiz, 1860 (Scyphozoa, Rhizostomida). *Biological Bulletin* 162:149-162.
- Chomczynski, P.; Mackey, K.; Drews, R. y Wilfinger, W. 1997. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* 22:550–553.
- ClustalX. <http://www.clustal.org/>
- Collins, A. 2002. Phylogeny of medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15(3):418-432.
- Coughlan, J.; Seymour, J. y Cross, T. 2006. Isolation and characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the box jellyfish (*Chironex fleckeri*, Cubozoa, Cnidaria). *Molecular Ecology Notes* 6:41–43.
- Curtis, H. 2000. Biología. 6ta. edición. Mc Graw Hill Interamericana. México.
- Davis L.; Dibner M. y Battey J. 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing, New York, NY, USA. 388pp.
- Dawson, M. 2004. Macro-morphological variation among cryptic species of the moon jellyfish, *Aurelia* (Cnidaria:Scyphozoa). *Marine Biology* 143(2):369-379.
- Dawson, M. 2005. Morphological variation and systematics in the Scyphozoa: *Mastigias* (Rhizostomeae, Mastigiidae) – a golden unstandard? *Hydrobiologia* 537(1-3):185-206.

- Dawson, M. 2004. Some implications of molecular phylogenetics for understanding biodiversity in jellyfishes, with emphasis on Scyphozoa. *Hydrobiologia* 530/531:249–260.
- Dawson, M. y Harmer, W. 2003. Geographic variation and behavioral evolution in marine plankton: the case of *Mastigias* (Scyphozoa, Rhizostomeae). *Marine Biology* 143:1161–1174.
- Dawson, M. y Martin, L. 2001. Geographic variation and ecological adaptation in *Aurelia* (Scyphozoa, Semaestomeae): some implications from molecular phylogenetics. *Hydrobiologia* 451:259–273.
- DNAMAN. <http://www.lynnon.com>
- Eckelbarger, K. y Larson, R. 1992. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the jellyfish *Linuche unguiculata* and *Stomolophus meleagris*, with a review of ovarian structure in the Scyphozoa. *Marine Biology* 114:633-643.
- Edwards J.; Naidoo R. y Poole S. 2001. Making the best of the pest that clogs the nets. Women in Fisheries, Secretary of the Pacific Community. Information Bulletin No. 8.
- Excoffier, L.; Smouse, P. Y Quattro, J. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetic data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

- France, S. y Hoover, L. 2002. DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiología* 471:149-155.
- Franco, J.; Agüero, G.; Cruz, A.; Rocha, A.; Navarrete, N.; Kato, E.; Flores, G.; Sánchez, S.; Abarca, L.; Bedia, C. 1991. Manual de ecología. 2ª. ed. Trillas. México. 266pp.
- Gómez-Aguirre, S. 1991. Contribución al estudio faunístico de celenterados y ctenóforos del plancton estuarino del Noroeste de México. *Anal Inst. Biol. UNAM. Ser. Zool.*, 62(1):1-10.
- Goudet, J.; Raymond, M.; DeMeeris, T.; T. Rousset, K. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetic* 144:1933-1940.
- Harley-Miller, 2001. Zoology. 4th Edition. McGraw Hill Companies. pp. 127-134.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G. 2008. Principles of population genetics. Sinauer Assoc. Inc. 652pp.
- Holland, B.; Dawson, M.; Crow, G. y Hofmann, D. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology* 145(6):1119-1128.
- Huang, D.; Meier, R.; Todd, P. y Chou, L. 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution* 66(2):167-174

- Kramp, P. 1961. Synopsis of the Medusae of the World. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 40:1-469
- Lee, J-S. 2000. The internally self-fertilizing hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) β -actin gene: amplification and sequence analysis with conserved primers. *Marine Biotechnology* 2:161–166.
- Leyva V. I. 2003. Marcadores moleculares para la identificación de la sardina del pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*). Tesis de Maestría. CIBNOR.
- López-Martínez, J. 2006. Estimaciones de abundancia de la medusa “Bola de Cañón” (*Stomolophus meleagris*) al sur de Sonora, para el establecimiento de una pesquería sustentable. Informe Científico. Guaymas, Sonora, México.
- López, J. y Álvarez, J. 2008. Medusa bola de cañón, recurso de explotación. *Ciencia y Desarrollo* 34(226):8-15.
- Mayer G. 1910. Medusae of the world. *Carnegie Institution of Washington*. Vol. I, II y III. 858pp.
- Mayr, E. y Ashlock, P. 1993. Principles of sistematic zoology. 2nd edn. McGraw-Hill, New York, N. Y.
- MEGA4. <http://www.megasoftware.net/>
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York. 512pp.
- Ocaña, A. y Gómez, S. 1999. *Stomolophus meleagris* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in two coastal lagoons of Oaxaca, Mexico. *Anal. Inst. Biol. UNAM Ser. Zoo.*, 70 (2):71-77.

- Omori, M. y Nakano, E. 2001. Jellyfish Fisheries in Southeast Asia. *Hydrobiologia* 451:19–26.
- Prada, C.; Schizas, N.; Yahioaka, P. 2008. Phenotypic plasticity or speciation? A case from a clonal marine organism. *BMC Evolutionary Biology* 8(47):1-19.
- Peggy, Y. H.; Fui-Ming, L.; Rudloe, J. 2001. Jellyfish as food. *Hydrobiologia* 451:11-17.
- Raymond, M. y Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Reuschel, S. y Shubart, C. 2007. Contrasting genetic diversity with phenotypic diversity in coloration and size in *Xantho poressa* (Brachyura : Xanthidae), with new results on its ecology. *Marine Ecology* 28:296-305.
- Rodríguez, C. y Meza, E. 2009. Características histológicas de las gónadas de medusas “pecosas”. Informe de Laboratorio de Histología. CIBNOR, S. C. México.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4 (4):406-425.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, Nueva York, EUA. 2100pp.
- SEAMAP - SA Shallow Water Trawl Survey. 2003. Results of trawling efforts in the coastal habitat of the South Atlantic bight. South Carolina Department of Natural Resources Marine Resources Division. Marine Resources Research Institute. 55pp.

- Sinniger F.; Reimer J.; Pawlowski J. 2008. Potential of DNA Sequences to Identify Zoanthids (Cnidaria: Zoantharia). *Zoological Science* 25(12):1253-1260.
- Smith, T. y R. Smith. 2007. Ecología. 6a Ed. Pearson Addison Wesley. Madrid, España.
- Swofford, D. 2000. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA. 257pp.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- Tamura, K. Dudley, J. Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596-1599.
- Thompson, J.; Higgins, D. y Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Thorpe, J.; Solé-Cava, A. y Watts, P. 2000. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hidrobiología* 420:165-168.
- Torres, R.; López, R. y Álvarez, F. 2001. Estimaciones de abundancia de la medusa “bola de cañón” (*Stomolophus meleagris*) al sur de Sonora para el establecimiento de una pesquería sustentable. Proyecto de Investigación. Guaymas, Son. México.
- Warburg, O. y Christian, W. 1941. Isolierung and kristallisation des garungsferments enolase. *Biochemistry* 310:340 p.

- Weir, B. S., 1996. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA, USA. 445pp.
- Weir, B. y Cockerham, C. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- West-Eberhard, M. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of ecology and systematic* 20:249-278.
- Zamponi, M. y Acuña, F. 1991. La variabilidad de los cnidocistos y su importancia en la determinación de clines. *PHYSIS, secc. A* 49(116-117):7-18.