

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías) y la CIC-UMSNH-2020-2024.

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2024. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Filogeografía de los peces lábridos *Halichoeres nicholsi* (Jordan
& Gilbert 1882) y *Halichoeres adustus* (Gilbert 1890) en el
Pacífico Tropical Oriental**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Seleny Morales García

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Seleny Morales García

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Omar Valencia Méndez
Codirector de tesis

Dr. Omar Domínguez Domínguez
Codirector de Tesis

Dra. Rosalía Aguilar Medrano

Dr. Tulio Fabio Villalobos Guerrero

Dr. Miguel Ángel Del Río Portilla



Dr. Rafael Andrés Cabral-Tena
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Seleny Morales García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ecología Marina.

Filogeografía de los peces lábridos *Halichoeres nicholsi* (Jordan & Gilbert 1882) y *Halichoeres adustus* (Gilbert 1890) en el Pacífico Tropical Oriental

Resumen aprobado por:

Dr. Omar Valencia Méndez
Codirector de tesis

Dr. Omar Domínguez Domínguez
Codirector de Tesis

El Pacífico Tropical Oriental (PTO) incluye cuatro provincias biogeográficas (Cortés, Mexicana Panámica y Galápagos) y cuatro regiones insulares (Revillagigedo, Malpelo, Cocos y Clipperton), separadas por brechas oceánicas, procesos oceanográficos y brechas arenosas (Sinaloa y Centroamericana). La historia evolutiva de los peces del PTO está influenciada por su ciclo de vida, por la geografía y oceanografía del PTO. Se hipotetizó que las poblaciones de *Halichoeres adustus* y *H. nicholsi* mostrarían diferenciación genética relacionada a estas barreras (brechas oceánicas y brechas arenosas) del PTO. Para determinar la historia evolutiva de ambas especies se analizó el marcador mitocondrial citocromo oxidasa 1 (*cox1*) y los nucleares Rodopsina (*Rho*) y Miosina (*Myo*) en 158 peces recolectados en 28 sitios del PTO, de manera particular en *H. nicholsi* se utilizó el gen nuclear *Rho*. La red de haplotipos, los valores de Φ_{ST} significativos, AMOVA, y las distancias genéticas, indican que las poblaciones de *H. adustus* para Isla del Coco y *H. nicholsi* para el archipiélago de Revillagigedo presentaron un aislamiento geográfico por diferencias genéticas en *cox1*. En *H. nicholsi*, la falta de aislamiento geográfico en el gen *Rho* pudo deberse a diferencias en las tasas de mutación y al tamaño efectivo poblacional entre el ADN mitocondrial y nuclear. La prueba de Mantel respaldó que la diferenciación genética fue debida a las barreras presentes en el PTO. En *H. adustus*, su preferencia por hábitats someros limita su dispersión a través de la brecha oceánica y el Domo de Costa Rica, desde y hacia la Isla del Coco; mientras que en *H. nicholsi*, la diferenciación genética se explica por la retención larval en remolinos de mesoescala y la baja influencia de corrientes oceánicas que refuerzan el aislamiento en Revillagigedo. Este estudio demuestra que las barreras (brechas oceánicas y procesos oceanográficos) y las características ecológicas (preferencia de hábitats) pueden limitar la dispersión de ambas especies en el PTO. Comprender la historia filogeográfica de ambas es crucial para su supervivencia, ya que permite conocer la diversidad genética y diseñar estrategias de conservación efectivas.

Palabras clave: biogeografía, barreras geográficas, Pacifico Tropical Oriental

Abstract of the thesis presented by **Seleny Morales Garcia** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology .

Phylogeography of the wrasses *Halichoeres nicholsi* (Jordan & Gilbert, 1882) and *Halichoeres adustus* (Gilbert 1890) in the Eastern Tropical Pacific

Abstract approved by:

Dr. Omar Valencia Méndez
Thesis co-director

Dr. Omar Domínguez Domínguez
Thesis co-director

The Eastern Tropical Pacific (ETP) includes four biogeographic provinces (Cortez, Mexican, Panamic, and Galápagos) and four insular regions (Revillagigedo, Malpelo, Cocos, and Clipperton), separated by oceanic gaps, oceanographic processes, and sandy barriers (Sinaloan and Central American). The evolutionary history of ETP fishes is shaped by their life cycle, as well as the geography and oceanography of the region. It was hypothesized that the populations of *Halichoeres adustus* and *H. nicholsi* would exhibit genetic differentiation associated with these barriers (oceanic gaps and sandy barriers) in the ETP. To infer the evolutionary history of both species, the mitochondrial marker cytochrome oxidase 1 (*cox1*) and the nuclear markers rhodopsin (*Rho*) and myosin (*Myo*) were analyzed in 158 specimens collected from 28 sites across the ETP. For *H. nicholsi*, the nuclear *Rho* gene was specifically utilized. The haplotype network, Φ_{ST} significant values, AMOVA, and genetic distances revealed geographic isolation with genetic differentiation in *H. adustus* at Isla del Coco and *H. nicholsi* in the Revillagigedo Archipelago based on *cox1* data. In *H. nicholsi*, the lack of geographic isolation observed in the *Rho* gene may be attributed to differences in mutation rates and effective population sizes between mitochondrial and nuclear DNA. The Mantel test supported that genetic differentiation was driven by the barriers present in the ETP. For *H. adustus*, its preference for shallow habitats limits its dispersal across the oceanic gap and the Costa Rica Dome, to and from Isla del Coco. Meanwhile, in *H. nicholsi*, genetic differentiation is explained by larval retention in mesoscale eddies and the limited influence of ocean currents, which reinforce isolation in Revillagigedo. This study demonstrates that barriers (oceanic gaps and oceanographic processes) and ecological traits (habitat preferences) can restrict the dispersal of both species within the ETP. Understanding the phylogeographic history of these species is crucial for their survival, as it provides insight into their genetic diversity and informs the design of effective conservation strategies.

Keywords: Biogeography, geographic barriers, Eastern Tropical Pacific

Dedicatoria

A Dios, por su amor y misericordia, ya que sin Él nada de esto sería posible. " Todo lo puedo en Cristo que me da fuerzas" (Filipenses 4:13, TLA).

A mis padres, por creer en mí y apoyarme en todo este proceso. En especial, a mi madre, por estar siempre a mi lado, incluso en la distancia. Gracias, mamá, por creer en mí. A mis hermanos, mis compañeros de toda la vida, gracias por su apoyo y a mis dos sobrinos, por la alegría que han traído a mi vida. Los amo, familia.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al de posgrado en Ecología Marina por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por el apoyo económico necesario para realizar mis estudios de Maestría y para la realización de la tesis.

Al Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por abrirme las puertas para realizar una estancia en los meses de septiembre a diciembre del 2023, lo cual fue necesario para la realización de la tesis.

A mis directores de tesis: el Dr. Omar Valencia Méndez y el Dr. Omar Domínguez Domínguez, por aceptarme como su alumna. Gracias por sus consejos y enseñanzas; he aprendido mucho de cada uno de ustedes. Pero, sobre todo, agradezco su paciencia y apoyo, no solo académico, sino también personal. Estoy muy agradecida de haberlos tenido como mis directores de tesis. ¡Gracias por enseñarme lo bonito que es hacer ciencia!

A mi comité de tesis: A la Dra. Rosalía Aguilar Medrano, Dr. Tulio Fabio Villalobos Guerrero y al Dr. Miguel Ángel Del Río Portilla, por aceptar ser parte del comité, por sus comentarios y observaciones que fueron muy útiles para el desarrollo de la tesis.

A la Dra. María Gloria Solís Guzmán, por su paciencia y enseñanza durante todo el trabajo de laboratorio, y por su apoyo en la amplificación de los genes nucleares. Gracias por todo.

A la Dra. Rosa Gabriela Beltrán López, por su apoyo en la revisión de los alineamientos, sus enseñanzas en los métodos estadísticos y su constante disponibilidad para aclarar mis dudas. Gracias por todo.

A Karim y Mariana Raya, agradezco todo su apoyo en enseñarme los análisis filogeográficos. Sobre todo, les agradezco por estar siempre disponibles para aclarar mis dudas. Gracias por todo

A mis amigos de Ensenada, ustedes se convirtieron en mi familia foránea. Siempre llevaré en mi corazón sus consejos y palabras de ánimo cuando creía que no lo lograría. Gracias por hacer que mi estancia en Ensenada fuera especial.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Las fuerzas evolutivas moldean la diversidad genética de las poblaciones.....	1
1.2 Filogeografía.....	1
1.3 Historia biogeográfica del Pacífico Tropical Oriental	4
1.4 Condiciones oceanográficas del PTO en la dispersión de peces arrecifales	6
1.5 Historia de vida de las especies <i>Halichoeres adustus</i> y <i>H. nicholsi</i>	8
1.6 Antecedentes	10
1.7 Justificación	12
1.8 Hipótesis.....	12
1.9 Objetivos	13
1.9.1 Objetivo general:.....	13
1.9.2 Objetivos específicos:.....	13
Capítulo 2. Metodología	14
2.1 Área de estudio y recolecta de organismos en el PTO.....	14
2.2 Análisis molecular	15
2.2.1 Extracción de ADN.....	15
2.2.2 Amplificación de genes	15
2.3 Análisis de datos.....	16

2.3.1	Índices de diversidad genética	16
2.3.2	Red de haplotipos.....	17
2.3.3	Diferenciación genética.....	17
2.3.4	Distancias genéticas	17
Capítulo 3.	Resultados.....	18
3.1	Universo muestral	18
3.1.1	Diversidad genética	18
3.1.2	Red de haplotipos.....	19
3.1.3	Diferenciación genética.....	21
3.1.4	Distancias genéticas	25
Capítulo 4.	Discusión	28
4.1	Diferenciación genética en islas oceánicas del PTO.....	29
4.1.1	Isla del Coco.....	30
4.1.2	Archipiélago de Revillagigedo	32
4.2	Comparación de patrones: <i>Halichoeres adustus</i> en el continente y <i>H. nicholsi</i> en el continente y Galápagos.....	35
Capítulo 5.	Conclusiones.....	38
	Literatura citada	39

Lista de figuras

Figura	Página
1. <i>Halichoeres adustus</i> (Gilbert, 1890) en fase juvenil hembra en (a) y (b) y <i>H. nicholsi</i> (Jordan y Gilbert, 1882) en fase adulta macho (c) y (d) fase juvenil. Fuente: figuras (a) (c) y (d) tomadas de Allison y Carlos Estapé, 2024 (www.carlosestape.photoshelter.com) y figura (b) de Robertson et al., 2024.	9
2. (a) Pacífico Tropical Oriental con los sitios de recolecta de <i>Halichoeres adustus</i> (Gilbert, 1890) (puntos rojos) y <i>H. nicholsi</i> (Jordan y Gilbert, 1882) (puntos azules) y (b) distribución geográfica de <i>H. nicholsi</i> (mapa superior) y <i>H. adustus</i> (mapa inferior). Los datos de las distribuciones de ambas especies, fueron obtenidos de Robertson et al., (2024).	14
3. Red de haplotipos de <i>Halichoeres adustus</i> (Gilbert, 1890), donde (a) es del gen <i>cox1</i> , (b) del gen <i>Rho</i> y (c) del gen <i>Myo</i> . El tamaño de los círculos corresponde a la frecuencia de cada haplotipo de acuerdo a la imagen adjunta y los colores representan las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO (Hastings, 2000). Las líneas trasversales corresponden a los pasos mutacionales.	20
4. Red de haplotipos de <i>Halichoeres nicholsi</i> (Jordan y Gilbert, 1882) donde (a) es del gen <i>cox1</i> y (b) del gen <i>Rho</i> . El tamaño de los círculos corresponde a la frecuencia de cada haplotipo de acuerdo a la imagen adjunta y los colores representan las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO (Hastings, 2000). Las líneas trasversales corresponden a los pasos mutacionales.	21
5. Asociación entre las distancias geográficas (km) y genéticas de Rousset (FST/1-FST) entre los individuos para ambas especies. <i>Halichoeres adustus</i> : (a) <i>cox1</i> , (b) <i>Rho</i> , y (c) con el gen <i>Myo</i> ; <i>H. nicholsi</i> : (d) <i>cox1</i> y (e) <i>Rho</i>	27

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Diversidad genética de <i>H. adustus</i> y <i>H. nicholsi</i> en las provincias del PTO, basadas en secuencias del gen mitocondrial <i>cox1</i> y en los genes nucleares <i>Rho</i> y <i>Myo</i> , obteniendo el número de secuencias (n), número de haplotipos (Hn), la diversidad haplotípica (Hd), la diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987) y el número de sitios polimórficos (S).....	19
2. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para muestras de <i>H. adustus</i> que prueban tres agrupaciones: (1) todos los individuos como población Panmítica (2) dos grupos de acuerdo a la formación de los haplogrupos (3) grupos basados en las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.....	23
3. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para muestras de <i>H. nicholsi</i> que prueban tres agrupaciones: (1) todos los individuos como población Panmítica (2) dos grupos de acuerdo a la formación de los haplogrupos (3) grupos basados en las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.....	24
4. Valores de distancia genética (<i>p-distance</i> %) en <i>H. adustus</i> por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal entre las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.....	25
5. Valores de distancia genética por grupos genéticos (<i>p-distance</i> %) en <i>H. adustus</i> por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal.	25
6. Valores de distancia genética (<i>p-distance</i> %) en <i>H. nicholsi</i> , por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal entre las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.....	26
7. Valores de distancia genética por grupos genéticos (<i>p-distance</i> %) en <i>H. nicholsi</i> por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal.	26

Capítulo 1. Introducción

1.1 Las fuerzas evolutivas moldean la diversidad genética de las poblaciones

La evolución biológica se define como los cambios genéticos y hereditarios que ocurren a lo largo del tiempo (Barbadilla, 2010). Estos cambios en la composición genética, son las variaciones en las frecuencias alélicas *-proporción relativa de diferentes alelos en una población-* y frecuencias genotípicas *-proporción relativa de diferentes genotipos en una población-* que las poblaciones presentan (Barbadilla, 2010). Considerando que las poblaciones suelen estar sujetas al efecto de diversas condiciones bióticas y abióticas diversas, con presiones de selección natural, el nivel de estructuración genética está determinado por su diferenciación, diversidad genética, la historia demográfica, los patrones de flujo génico en el contexto de la evolución, las tasas de mutaciones y el tamaño poblacional a diferentes escalas de tiempo y espacio (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). Se considera diversidad genética a las diferencias en el material hereditario entre dos o más organismos, ya sea a nivel de los componentes básicos *-los nucleótidos individuales: adenina, timina, guanina y citosina-* que conforman la cadena de ADN *-ácido desoxirribonucleico-*, o a nivel de genes, cromosomas e incluso genomas completos (Barbadilla, 2010). De tal manera que la diversidad genética determina el potencial evolutivo de las poblaciones; por ejemplo, una pérdida en dicha diversidad genética provocaría una reducción en la habilidad de las poblaciones para adaptarse a ambientes cambiantes, conllevando a procesos de extinción locales o regionales (Munday, 2004). La diversidad genética estará sujeta a diferentes fuerzas evolutivas como la selección natural, deriva genética, flujo genético, tasas de mutaciones y endogamia (Barbadilla, 2010). En conclusión, la diversidad y variación genética es la base para la evolución biológica y la razón por la cual existen una variedad de formas y funciones en los seres vivos. Además, es fundamental en la adaptación y respuesta de los organismos en un ambiente dinámico. Entenderla y conservarla es esencial en la sostenibilidad de los ecosistemas y la supervivencia de las especies (Avice, 1998).

1.2 Filogeografía

La biogeografía es una rama de la biología que estudia los procesos históricos y ecológicos que generan los patrones espaciales de la distribución de las especies (Briggs y Bowen, 2012). Los patrones biogeográficos son fundamentales para identificar regiones del mundo que albergan áreas de innovación

evolutiva o refugios con biota ancestral. Además, permiten reconocer los puntos de mayor biodiversidad, conocidos como "hotspots" o "puntos calientes" de biodiversidad (Barber y Bellwood, 2005). La filogeografía es una subdisciplina de la biogeografía que se centra en los principios y procesos que han generado la distribución geográfica actual de los linajes genealógicos (Avice et al., 1987). El estudio de la distribución de estos linajes, requiere la contribución de disciplinas como la genética de poblaciones, genética molecular, demografía, filogenética, sistemática, geografía y oceanografía (Avice, 2000). Debido a su enfoque integrador, la filogeografía se ha destacado como una de las subdisciplinas más unificadoras en la biología (Hickerson et al., 2010). Es una subdisciplina que permite detectar la estructura genética y comprender los patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie; al relacionarse con los eventos geológicos y oceanográficos en espacio y tiempo, se puede obtener y describir la historia evolutiva de los linajes genealógicos (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). Además, las aproximaciones filogeográficas pueden inferir procesos demográficos históricos, tales como, determinar el flujo génico, el tamaño efectivo de la población, la secuencia de colonización, los cuellos de botella, así como para determinar las fronteras entre especies y la identificación de unidades de conservación (Freeland, 2011; Avice, 2009, 2000; Vázquez-Domínguez, 2002, 2007; Avice et al., 1987).

Para el desarrollo de los estudios filogeográficos ha sido fundamental la utilización de marcadores genéticos o secuencias homólogas de ADN que no presentan recombinación -*Un marcador genético es una característica o secuencia de ADN que son utilizados para identificar o rastrear ciertos genes o regiones específicas del genoma (Avice, 2000)* -. Dentro de los marcadores genéticos utilizados, el ADN mitocondrial (ADNmt) contiene variantes, i.e. secuencias, llamadas haplotipos que son registros de mutaciones matrilineales. Estos haplotipos pueden conectarse en un árbol de genes que muestra los cambios en las secuencias a lo largo del tiempo (Avice, 2000). Los métodos para inferir la historia evolutiva a partir de árboles de genes incluyen los modelos de coalescencia, la inferencia filogenética mediante máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana, y los análisis de redes de genealogía. La coalescencia es un proceso aleatorio que muestra cómo los eventos genéticos en una población, influyen en la genealogía de las secuencias de genes muestreadas, manteniendo como hipótesis de que todos los individuos de una población provienen de un ancestro común, el cual aún puede estar presente en la población muestreada (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). Las secuencias de ADNmt son consideradas útiles debido que presentan las siguientes tres características: (1) en general, se heredan exclusivamente de la madre, permitiendo trazar líneas de descendencia matrilineales (Anderson et al., 1995); (2) contienen altas tasas de mutaciones, proporcionando una mayor resolución temporal y permitiendo el análisis de eventos evolutivos más recientes (Lanteri y Confalonieri, 2003); y (3) células somáticas con múltiples copias de

ADNmt, facilitando su extracción y amplificación en comparación con los genes nucleares *-que generalmente poseen menor cantidad de copias-* (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

Uno de los marcadores mitocondriales usados en estudios de filogeografía es el gen de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa (*cox1*), debido a que su amplificación es rápida y eficiente (Hebert et al., 2003). Además, dispone de una gran cantidad de secuencias en repositorios públicos por ser el gen predominante del “Código de Barras de la Vida” (Hebert et al., 2003), facilitando la comparación de secuencias de ejemplares de diferentes regiones que han sido muestreados por diversos grupos de investigación (Scataglini et al., 2006; Carisio et al., 2004) y el desarrollo de estudios a gran escala que optimiza tiempos y costos de análisis. Sin embargo, el uso exclusivo de ADNmt puede resultar impreciso, ya que se basa en un único locus que puede estar sujeto a selección natural, presentar introgresión o bien dificultar la identificación del flujo de genes entre poblaciones (Avice, 2009; Vázquez-Domínguez et al., 2009). Estas consideraciones pueden limitar la reconstrucción de las historias poblacionales (Avice, 2000). Por lo tanto, para tener mayor robustez al inferir historias filogeográficas suelen emplearse, además de los ADNmt, marcadores genéticos del ADN nuclear (ADNn) (Hare, 2001), es decir, aquellos que se encuentran en el ADN de los cromosomas del núcleo de las células eucariontes (Hare, 2001). Los genes nucleares que han experimentado flujo génico entre individuos, tienen una alta probabilidad de recombinarse genéticamente durante el apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis. Este proceso puede cambiar las genealogías de las secuencias. Sin embargo, existen dos enfoques de análisis para enmendar esta particularidad: (1) realizar reconstrucciones y comparaciones utilizando más de un gen para evaluar la congruencia en las historias filogeográficas estudiadas, aumentando la probabilidad de que la reconstrucción sea robusta; o (2) comparar las historias filogeográficas de varias especies que coexisten o comparten una misma área geográfica (Avice, 2009, 2000; Zink, 2002; Arbogast y Kenagy, 2001).

Entre los genes nucleares, el gen *Rho* codifica la rodopsina, una proteína presente en los bastones de la retina, esencial para la generación de reacciones químicas transmitidas al cerebro y en la formación de imágenes visuales en condiciones de baja luminosidad. *Rho* es relativamente pequeño en comparación con otros genes nucleares, codifica una proteína de aproximadamente 350 aminoácidos y contienen alrededor de cinco exones; es altamente conservador y debido a eso presenta una tasa de sustitución nucleotídica baja. Sin embargo, puede ser útil para obtener resultados congruentes en estudios filogeográficos (Avice, 2009, 2000; Zink, 2002; Arbogast y Kenagy, 2001). Por otra parte, el gen *Myo* codifica a la miosina, una proteína encargada de la contracción muscular y el transporte intracelular en los organismos eucariontes (Hofmann et al., 2009). Al combinar información de genealogías obtenidas de

datos de ADNmt y ADNn tales como *cox1*, *Rho* y *Myo*, y al emplear diferentes enfoques de análisis, se puede mejorar la comprensión de la evolución de las poblaciones, los movimientos poblacionales -*flujo génico*- y la historia filogeográfica.

1.3 Historia biogeográfica del Pacífico Tropical Oriental

El Pacífico Tropical Oriental (PTO) es un área biogeográfica tropical y subtropical de América, que se extiende desde el Golfo de California en su límite norte, hasta el norte de Perú en su límite sur, incluyendo los complejos insulares conformado por el archipiélago de Galápagos y Revillagigedo, así como las islas Malpelo, Isla del Coco y el atolón de Clipperton (Figura 2) (Fiedler y Lavín, 2014). El PTO es una región independiente por una variedad de características biológicas y oceanográficas, pero también por las propias barreras marinas y terrestres. El PTO está aislado geográficamente del Mar Caribe por el levantamiento del istmo de Panamá hace aproximadamente 2.8 millones de años (Coates et al., 2005). Además, está separado del Pacífico central y occidental por la Barrera del Pacífico Oriental, que es la barrera marina de aguas profundas más ancha del mundo que limita la dispersión de organismos marinos costeros, abarcando entre 4,000 y 7,000 km de extensión (Ekman, 1953). Robertson et al. (2004), consideran que solo unas pocas especies con periodos larvales de larga duración pueden migrar exitosamente a través de esta barrera.

La distribución de especies marinas está estrechamente relacionada con las biorregiones marinas. Ekman (1953) sugiere que los océanos del mundo se caracterizan por presentar diversas regiones o subregiones a gran escala. En el caso de la plataforma continental, identificó regiones en aguas cálidas, templadas y polares, cada una separada por barreras zoogeográficas con alto grado de endemismo. Para determinar la subdivisión del PTO, Walker (1960) estableció dos provincias en el Pacífico de México, con base en los endemismos ($\geq 10\%$) de peces arrecifales: (1) la provincia de Cortés, que incluyó la costa del Pacífico de Baja California por debajo de los 25° N y todo el Golfo de California y (2) la provincia Mexicana que abarca la costa de México desde Mazatlán, Sinaloa, hasta alcanzar el istmo de Tehuantepec, Oaxaca. Posteriormente, Briggs (1974) empleó información detallada sobre la distribución regional de peces arrecifales basada en su grado de endemismo, pero dividió el PTO en tres provincias, dos de ellas continentales: la Mexicana que se extiende desde la costa del Pacífico de Baja California ($\sim 25^\circ$ N), incluyendo el Golfo de California, hasta el norte del golfo de Tehuantepec ($\sim 16^\circ$ N) y la Panámica, que abarca desde el límite sur de la provincia Mexicana hasta la frontera entre Ecuador y Perú ($\sim 3^\circ$ S); mientras que la tercera provincia es insular, correspondiente al archipiélago de Galápagos, por sus altos niveles de

endemismos locales de grupos taxonómicos como las algas, corales, moluscos, crustáceos (cangrejos) y peces costeros (Walker 1966). Más tarde, Rosenblatt (1974) y Thomson et al. (1979) describieron una distribución más extensa de peces arrecifales en el Golfo de California, apoyando la idea de Walker (1960).

Por otra parte, Hastings (2000) dividió el PTO en cuatro provincias basado en la distribución de peces de la familia Chaenopsidae Gill, 1865: Cortés, Mexicana, Panámica y Galápagos; y cuatro regiones insulares: Clipperton, Cocos, Malpelo, y el archipiélago de Revillagigedo. Además de las provincias, consideró barreras para la dispersión que son características de costas rocosas en el PTO, definidas como brechas - *brechas biogeográficas son zonas donde existe una interrupción o ausencia de la distribución de las especies o poblaciones (Escalante, 2009)*-. Estas brechas incluyen extensiones de hábitat pelágico que separan las islas oceánicas del continente y dos discontinuidades en el hábitat arrecifal costero: (1) la “brecha de Sinaloa” abarca desde Topolobampo hasta Mazatlán en Sinaloa (~370 km); (2) la “brecha centroamericana” se extiende desde el Istmo de Tehuantepec en México hasta el arrecife de los Cobanos, en El Salvador (~700 km). Debido a que presentan fondos arenosos, estas brechas podrían actuar como barreras físicas para la dispersión de peces arrecifales y de fondos someros rocosos; esta característica específica puede dar lugar a una ruptura en la conectividad genética entre las poblaciones. Hastings (2000) plantea que estas dos brechas arenosas, junto con la brecha pelágica, establecen los límites hipotéticos entre las cuatro provincias biogeográficas del PTO y juegan un papel importante en los procesos de especiación de esta región.

Entre las subdivisiones biogeográficas de las ecorregiones del mundo más recientes está la que propusieron Spalding et al. (2007). En dicho estudio dividieron al PTO considerando las siguientes características: (1) definieron el límite norte del PTO en 20° N en el continente y (2) la exclusión de la península de Baja California y el Golfo de California del PTO. Simultáneamente, el PTO fue dividido en dos provincias: (1) Pacífico Tropical del Este y (2) Galápagos. En contraste, Robertson y Cramer (2009) basándose en una base de datos que incluye la distribución de 1261 especies de peces costeros, consideraron todas las islas oceánicas del PTO como una sola provincia -*islas del norte y sur*- y dividieron las provincias continentales en Cortés y Panámica. El presente estudio se basó en la regionalización del PTO propuesta por Hastings (2000), debido a que uno de los objetivos es evaluar si las brechas biogeográficas y oceánicas (entre isla y continente o viceversa) influyen en la fragmentación de las poblaciones de *Halichoeres adustus* (Gilbert, 1890) y *H. nicholsi* (Jordan y Gilbert, 1882) las cuales son especies con preferencia de hábitat somero y rocoso. Esta regionalización permitió realizar un análisis detallado y específico del efecto de dichas barreras en la evolución de las poblaciones insulares y

continentales, facilitando la comprensión de los patrones de fragmentación y conectividad genética en la región estudiada.

1.4 Condiciones oceanográficas del PTO en la dispersión de peces arrecifales

Algunos peces, pero en particular los arrecifales, tienen una etapa larvaria planctónica, que es fundamental en la dispersión y distribución de las especies. La distancia que las larvas pueden recorrer antes de asentarse, está influenciada principalmente por la duración de esta fase larvaria pelágica. Sin embargo, estudios realizados por Victor y Wellington (2000) encontraron que muchas especies endémicas de áreas restringidas tenían fases larvales pelágicas más largas, mientras que especies con amplios rangos geográficos presentaban duraciones larvales más cortas, sugiriendo que otras variables, además de las biológicas, intervenían en su dispersión. En este contexto, para poder comprender mejor la fragmentación de las poblaciones de los peces arrecifales en el Pacífico Tropical Oriental, es fundamental considerar no solo variables bióticas, sino también las abióticas que, además, involucran a los diferentes procesos oceanográficos, e. g., las surgencias costeras, giros oceánicos, corrientes oceánicas, brechas arenosas y extensiones de mar profundo.

El Pacífico Tropical Oriental se extiende desde los 23.5° N hasta los 6° S, se encuentra delimitado por la Corriente de California al norte y la Corriente de Perú al sur (Glynn y Ault, 2000). En esta región se presentan corrientes marinas que influyen significativamente en el clima y en los procesos ecológicos, creando un ambiente único y diverso. Entre las principales corrientes latitudinales que conforman el PTO, se encuentran la Corriente Costera de Costa Rica y la Corriente Costera Mexicana (CCM), ambas fluyen de sur a norte a lo largo de la costa. La CCM con un ancho de 90–180 km y una profundidad de 250–400 m, es generada por los vientos locales a través del equilibrio de Sverdrup (Godínez et al., 2010) y se extiende desde golfo de Tehuantepec en Oaxaca, hasta la entrada del Golfo de California. Longitudinalmente el sistema de corrientes ecuatoriales está constituido principalmente por tres corrientes superficiales: la Corriente Ecuatorial del Norte, la Corriente Ecuatorial del Sur ambas en dirección hacia el oeste y la Contracorriente Ecuatorial del Norte que va hacia el este. Además, convergen la Corriente Subsuperficial Ecuatorial, cuya posición está restringida al ecuador y la Corriente de Panamá que fluye hacia el oeste desde la costa de Panamá y Colombia (Robertson et al., 2024). Comprender la dinámica de estas corrientes es esencial para analizar los patrones de dispersión de las especies arrecifales en el PTO. Además, el PTO se distingue por presentar aguas superficiales cálidas y de baja salinidad, y una termoclina superficial y poco profunda (50-60 metros) (Fiedler y Lavín, 2014).

En términos ecológicos, el PTO es parte de un bioma tropical influenciado por los vientos alisios y corrientes ecuatoriales. En este contexto, la interacción de los vientos invernales que soplan hacia el mar, en conjunto con el flujo de corrientes hacia al norte a lo largo de la costa continental, generan tres grandes sistemas de surgencias costeras. Estos sistemas atraen agua a la superficie en el lado sureste y se intensifican por las depresiones del golfo de Tehuantepec en el sur de México, en el golfo de Papagayo al norte de Costa Rica y en el golfo de Panamá, al este de Panamá y Colombia, en donde los vientos invernales concentran e intensifican su fuerza, generando remolinos anticiclónicos. Estas surgencias se caracterizan por presentar masas de agua fría (16-23°C) con altos niveles de nutrientes, incluyendo concentraciones de nitratos y fosfatos, y una elevada producción primaria que puede representar hasta el 22% de la productividad en el PTO (Fiedler y Lavín, 2014).

El PTO se extiende por ambos hemisferios, norte y sur, lo que significa que las temperaturas del agua en esta región están influenciadas por las estaciones opuestas de cada hemisferio: cuando es invierno en el norte es verano en el sur y viceversa. Además, cuenta con tres zonas climáticas: la ecuatorial, la tropical y la subtropical. La sección ecuatorial, que va desde Costa Rica hasta Ecuador, es considerada la zona más compleja de la región en términos de sus corrientes, con temperaturas cálidas que promedian 25°C. Además, la fría corriente de Perú (con una media de 14 °C), que se desplaza del sur hacia el norte a lo largo de la costa sudamericana, llega hasta cerca del ecuador en donde gira hacia el oeste en dirección al Pacífico central, influyendo así en la temperatura de la franja costera del Pacífico ecuatorial, así como en las Islas Galápagos (Robertson et al., 2024).

Por otra parte, el fenómeno de El Niño (ENSO) tiene un impacto notable en la distribución de las temperaturas máximas (28 °C en promedio) y mínimas (22 °C en promedio) en todo el PTO, especialmente en el borde sur de la región cerca del ecuador. Durante un evento de El Niño, las temperaturas aumentan en toda la región y la Corriente de Perú se debilita. Por el contrario, durante La Niña, la Corriente de Perú se fortalece y las temperaturas disminuyen considerablemente a lo largo del ecuador (Robertson et al., 2024). Uno de los primeros efectos causados por el ENSO es el blanqueamiento del tejido en corales zooxantelados, el cual puede manifestarse durante períodos de anomalías térmicas tanto elevadas (El Niño) como reducidas (La Niña). Sin embargo, los cambios en la circulación oceánica provocados por el ENSO afectan de manera más predecible la abundancia y distribución de los peces de arrecifes en el PTO.

El calentamiento generalizado del océano, junto con las inversiones y alteraciones en las corrientes superficiales durante los eventos de El Niño, favorecen una dispersión y reclutamiento más eficientes de ciertos grupos de peces en la región (Glynn et al., 2017). Lo anterior ha sido demostrado en especies de

lábridos y pomacéntridos con periodos larvarios largos (Meekan et al., 2001; Wellington y Victor, 1989). Además, se han registrado en la región extensiones de rango de especies tropicales, ampliando su distribución hacia los límites norte (Baja California) y sur (islas Galápagos) (Glynn et al., 2017). Por lo tanto, los eventos ENSO, tanto El Niño como La Niña, no solamente generan cambios en la temperatura y circulación oceánica del PTO, sino también influyen en la distribución de especies y en la dispersión de larvas a lo largo del PTO. Finalmente, para entender mejor la estructura genética de las poblaciones de peces arrecifales en el PTO, es esencial integrar tanto los factores biológicos, así como los procesos oceanográficos. Entre estos últimos, las corrientes y surgencias, pueden determinar la conectividad entre poblaciones y explicar la fragmentación geográfica observada en especies endémicas y de distribución restringida (Lessios y Baums, 2017). Las interacciones entre estos factores también son relevantes para comprender los patrones evolutivos y la especiación en el PTO.

1.5 Historia de vida de las especies *Halichoeres adustus* y *H. nicholsi*

Halichoeres adustus (Gilbert, 1890) se encuentra en las islas Revillagigedo, Galápagos, Isla del Coco y Tres Marías en el PTO, y ha sido registrada como errante en Cabo San Lucas (Baja California Sur), Costa Rica, provincia Mexicana y Colombia (Figura 2). Habita en fondos rocosos de la zona intermareal a profundidades entre 1 y 5 m, y debido a su distribución restringida y su hábitat en aguas someras, se clasifica como Vulnerable según el Criterio D2 (Allen y Edgar, 2010). Además, es una especie planctívora, aunque su dieta también incluye la ingesta de copépodos, anfípodos y demás microfauna (Robertson et al., 2024). En su fase inicial, los juveniles presentan una coloración con barras y manchas negruzcas y blancas; mientras que en su fase final juvenil presentan una coloración negruzca, con bordes y manchas azules en las escamas, los adultos alcanzan una longitud de 12.5 cm (Figura 1a y 1b). La especie muestra dimorfismo sexual; los machos adultos presentan puntos azules en la cabeza, cuerpo y aletas, en contraste las hembras y juveniles presentan un ocelo negro en la aleta dorsal suave; las larvas poseen una barra blanca humeral y un ocelo negro con borde blanco (Robertson et al., 2024). Al igual que muchos lábridos tienen un comportamiento de apareamiento complejo y un hermafroditismo protogínico, es decir, primero madura sexualmente como hembra y después puede cambiar a macho. Asimismo, la larva presenta una duración pelágica de 38 días (Víctor y Wellington, 2000).

Halichoeres nicholsi (Jordan y Gilbert, 1882) se distribuye desde el Golfo de California hasta Panamá, incluyendo las islas oceánicas del PTO, excepto el atolón de Clipperton (Figura 2). Habita en fondos de arenas cerca de los arrecifes de coral y en fondos rocosos y presenta un rango de profundidad de 1-82 m

(Allen et al., 2010). Consume pequeños invertebrados, como crustáceos, moluscos y algas marinas. Presenta dimorfismo sexual, los machos tienen fases de coloración más brillante y distinto a las hembras. Morfológicamente en la fase inicial presentan un tono verde claro en la parte superior y blanco hacia la parte inferior; a lo largo de la mitad del costado, se distingue una franja difusa de color negrozco que está conectada por una barra corta de la misma tonalidad, ubicada debajo de la base de la parte anterior de la aleta dorsal. Los juveniles se caracterizan por tener una tonalidad que varía de blancuzca a amarillenta, con franjas y manchas negras irregulares en sus costados; también presentan una mancha negra con forma de ojo (ocelada) de gran tamaño en la mitad de la aleta dorsal. En su fase adulta, tienen un cuerpo delgado y comprimido, una cabeza pequeña y puntiaguda, dientes caniniformes y agrandados, con dos pares anteriores en cada mandíbula, una aleta dorsal continua de 9 espinas; una línea lateral con 28 escamas; y el cuerpo es verde azulado, con una barra vertical oscura cerca del borde posterior de la aleta pectoral, precedida por una mancha amarilla (Robertson et al., 2024) (Fig. 1c y 1d). Todas las aletas, excepto las pectorales, son azules, y están moteadas con manchas y rayas rojas o de colores claros (Gomon, 1995). La especie puede alcanzar 38 cm de longitud. Además, presenta una fase larvaria de 38 días (Víctor y Wellington, 2000).

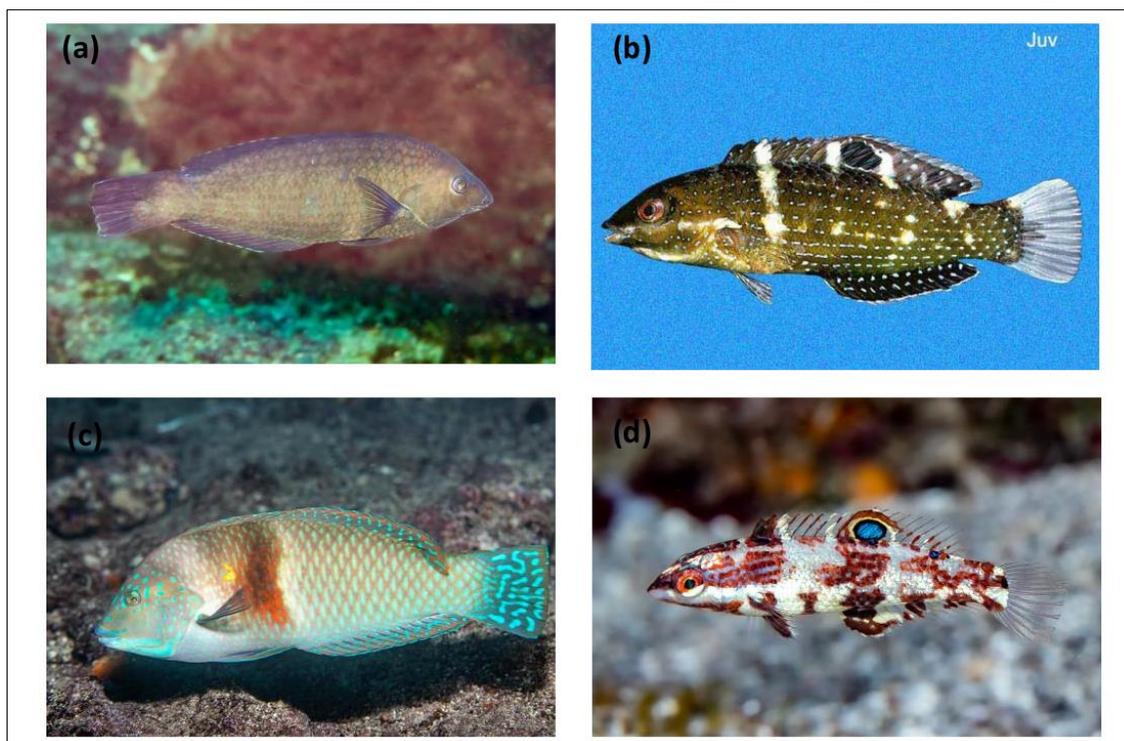


Figura 1. *Halichoeres adustus* (Gilbert, 1890) en fase juvenil hembra en (a) y (b) y *H. nicholsi* (Jordan y Gilbert, 1882) en fase adulta macho (c) y (d) fase juvenil. Fuente: figuras (a) (c) y (d) tomadas de Allison y Carlos Estapé, 2024 (www.carlosestape.photoshelter.com) y figura (b) de Robertson et al., 2024.

1.6 Antecedentes

Pocos estudios se han enfocado en estudiar el género *Halichoeres* (Labridae), comúnmente denominado como “señoritas”, incluidas las especies de *Halichoeres adustus* y *H. nicholsi*. Barber y Bellwood (2005) realizaron un estudio para estimar los puntos calientes de biodiversidad o “hotspots” y el origen evolutivo de 35 especies de “señoritas” (*Halichoeres*: Labridae), -seis del Atlántico Occidental, cuatro del Pacífico Oriental, y 25 del Indo-Pacífico Occidental-. Realizaron análisis filogenéticos y filogeográficos con 1700 a 1800 pares de bases de genes mitocondriales *cox1* -citocromo oxidasa I- y los genes ribosomales 16s y 12s. Las secuencias fueron analizadas utilizando tanto el método de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML). Para determinar los orígenes geográficos de las especies en el continente americano y en el Archipiélago Indo-Australiano (AIA) realizaron reconstrucciones biogeográficas utilizando DIVA versión 1.1. El género *Halichoeres* resulto de origen polifilético en el Indo-Australiano. Sin embargo, en el continente americano -Atlántico Occidental y Pacífico Oriental- el género *Halichoeres* es monofilético. También encontraron que el clado del continente americano tiene un origen ancestral en el Pacífico Oriental, lo cual es consistente con un sólo evento de colonización a través de la Barrera del Pacífico Oriental. Los autores, sugieren que este linaje se originó en el continente americano hace 14.8-23.5 millones de años, coincidiendo con el cierre del Mar de Tetis entre 15-18 millones de años. Finalmente, la mayor parte de la diversidad de *Halichoeres* de AIA se desarrolló durante el Mioceno y el Plioceno, sin que los cambios en el nivel del mar durante el Pleistoceno tuvieran un impacto significativo en la diversificación de peces de arrecife.

Rocha (2004) estudió si la variación en el patrón de coloración y las barreras biogeográficas afectan de igual manera a las especies con el mismo potencial de dispersión. Para lograr sus objetivos analizó poblaciones de *Halichoeres cyanocephalus* y *H. maculipinna*, en los dos costados marinos del efluente del río Amazonas, la principal barrera biogeográfica en el Atlántico Tropical y *H. garnoti* del Caribe y Bermuda. Utilizó como marcador molecular el gen *citocromo b* del ADN mitocondrial. Obtuvo que las divergencias genéticas entre las poblaciones separadas por la pluma del río Amazonas fueron de 2.3% en *H. cyanocephalus* y 6.5% en *H. maculipinna*. En el caso de *H. garnoti*, encontró que la población de Bermudas y el Caribe están interconectadas, sugiriendo que las diferencias en la coloración eran independientes del gen *citocromo b*. Finalmente, concluye que no todas las especies de *Halichoeres* del Atlántico muestran la misma estructura genética, debido a su capacidad de dispersión. Además, las diferencias de color entre algunas especies no se correlacionaron con las diferencias genéticas en el gen *citocromo b*. Por lo tanto, sugieren no usar las diferencias de color como único criterio para clasificar estas especies de peces, a

menos que estén respaldadas por evidencia genética y morfológica. El autor comenta que la separación geográfica por sí sola no explica el patrón observado, es probable que la dispersión entre las áreas después de la formación del río Amazonas haya sido un factor crucial en la evolución de *Halichoeres* en el Atlántico occidental. Finalmente menciona que las condiciones ambientales del agua también influyeron en la genética de estas especies. Por ejemplo, se encontraron diferencias genéticas entre las especies que viven en las aguas turbias ricas en sedimentos de Brasil en comparación con aquellas de aguas claras del mar Caribe.

Ludt et al. (2012) realizaron un estudio filogeográfico de cuatro especies de “señoritas” del Indo-Pacífico: *Halichoeres claudia* con distribución en todo el Indo-Pacífico, *H. ornatus* una especie endémica de los arrecifes exteriores de Hawái, y *H. margaritaceus* y *H. trimaculatus* nativa en lagunas costeras del Indo-Pacífico. La estructura poblacional y la historia evolutiva de cada especie la analizaron usando dos marcadores mitocondriales: *cox1* y *región control*. Como resultado obtuvieron que las cuatro especies de lábridos presentaron una diversidad haplotípica y nucleotídica similar, y que los lábridos que habitan en lagunas costeras presentaron una estructura poblacional mayor y una historia poblacional más antigua que las especies del arrecife exterior. Además, las discrepancias en las distribuciones y los valores negativos significativos ($P < 0.001$) de Fu's *F* -variaron de -31.71 a -14.55-, es indicativo de una expansión poblacional que sucedió durante el Pleistoceno. Finalmente, concluyeron que las fluctuaciones en el nivel del mar durante el Pleistoceno alteraron los hábitats de los arrecifes y las lagunas costeras; asimismo, mencionan que todas las especies experimentaron un evento de cuello de botella, pero con diferentes intervalos.

Dada la amplia heterogeneidad ambiental, las barreras a la conectividad genética en el Pacífico Tropical Oriental, y las características biológicas específicas de ambas especies -*preferencias de hábitats, intervalos de profundidad y rangos de temperatura*- en el presente estudio nos planteamos las siguientes preguntas de investigación: ¿Existe una población panmíctica de *H. adustus* y *H. nicholsi* a lo largo del PTO? y ¿qué impacto tienen las barreras biogeográficas en la distribución espacial de los linajes genealógicos de estas especies? Para abordar estas preguntas, utilizaremos las herramientas de la filogeografía para dilucidar como los eventos históricos y procesos evolutivos han afectado la composición genética de estas especies en estudio.

Además, permitirá entender como estos eventos y procesos han dado forma a la biodiversidad biológica a lo largo del tiempo y el espacio, y con ello abordar cuestiones relacionadas con la conservación de estas especies.

1.7 Justificación

Dentro del Pacífico Tropical Oriental, las 15 especies del género *Halichoeres* representan la mayor radiación monofilética de lábridos en esta región. Estas especies presentan una amplia distribución a lo largo del PTO, habitando en diversos hábitats como arrecifes de coral, arrecifes rocosos, fondos arenosos, praderas marinas y algas. Además, algunas especies tienen un rango de distribución limitado y preferencias de hábitat específicas, lo que las convierte en un grupo excelente para los estudios filogeográficos.

El estudio comparativo de la filogeografía de *Halichoeres adustus*, una especie con distribución restringida, y *Halichoeres nicholsi* con un rango de distribución más amplio, permitirá analizar la concordancia en la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Además, ayudará a determinar los procesos evolutivos que han moldeado su historia en el espacio y el tiempo, así como la influencia de las barreras biogeográficas en la distribución actual de los linajes. Al conocer la historia evolutiva de estas especies se pueden tomar decisiones informadas para la protección de estas poblaciones que garanticen su permanencia y conservación a largo plazo, particularmente aquellas con distribuciones restringidas o poblaciones con baja diversidad genética. Además, comprender el pool génico y la diversidad genética de ambas especies de lábridos, permitirá identificar áreas con alta y baja diversidad genética. Esto contribuirá a un conocimiento más detallado de la diversidad genética, fundamental para la adaptación de las poblaciones a los cambios ambientales y para su supervivencia a largo plazo.

1.8 Hipótesis

Debido a que *Halichoeres adustus* y *Halichoeres nicholsi* son especies asociadas a arrecifes rocosos y coralinos someros, se espera que las poblaciones presenten una estructuración genética en función de las barreras de hábitat presentes en su área de distribución -*brechas arenosas de Centroamérica y Sinaloa, y brecha oceánica entre las islas-continente*-. Esta estructuración podrá estar influenciada también por los rasgos biológicos y ecológicos de las especies -*hábitat y capacidad de dispersión*-, así como las oceanográficas del PTO -*la Corriente Costera de Costa Rica y la Corriente de Panamá*-.

Por lo tanto, hipotetizamos que la historia filogeográfica de *H. adustus* y *H. nicholsi* a lo largo del PTO mostrará una estructura poblacional diferenciada y patrones de diversificación asociados con eventos históricos y barreras geográficas y oceanográficas en la región.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general:

Determinar la historia evolutiva de *Halichoeres adustus* y *Halichoeres nicholsi* a lo largo del Pacífico Tropical Oriental.

1.9.2 Objetivos específicos:

- Estimar la diversidad genética en poblaciones de *H. adustus* y *H. nicholsi*.
- Estimar la historia filogeográfica de *H. adustus* y *H. nicholsi*.
- Determinar la influencia de las brechas biogeográficas en las poblaciones de *H. adustus* y *H. nicholsi*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio y recolecta de organismos en el PTO

Durante febrero del 2010 a diciembre del 2019 se realizaron recolectas en 28 sitios distribuidos en las tres provincias continentales del PTO según Hastings (2000) -Cortés, Mexicana y Panámica-, además del archipiélago de Revillagigedo -Isla Socorro e Isla Clarión-, Isla del Coco y la provincia de las Islas Galápagos abarcando la mayor parte del rango de distribución geográfica de las especies (Figura 2).

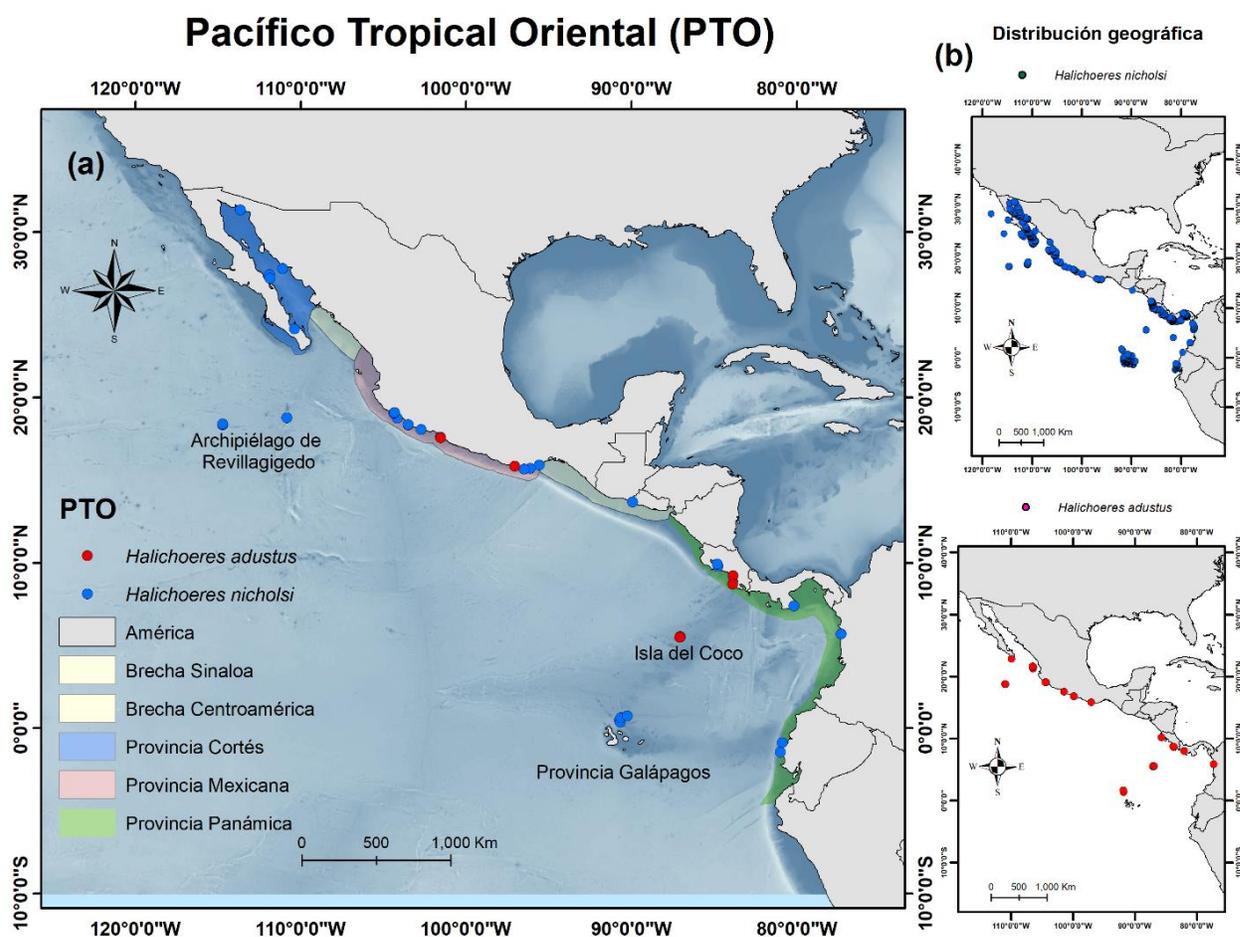


Figura 2. (a) Pacífico Tropical Oriental con los sitios de recolecta de *Halichoeres adustus* (Gilbert, 1890) (puntos rojos) y *H. nicholsi* (Jordan y Gilbert, 1882) (puntos azules) y (b) distribución geográfica de *H. nicholsi* (mapa superior) y *H. adustus* (mapa inferior). Los datos de las distribuciones de ambas especies, fueron obtenidos de Robertson et al., (2024).

En las zonas arrecifales, los peces fueron capturados mediante buceo SCUBA usando arpones tipo

hawaiana. En el caso de la zona intermareal, se empleó un anestésico natural a base de aceite de clavo en una proporción de 0.05:1 diluido en alcohol al 70%. Este método permitió que los peces quedaran “estáticos”, para posteriormente ser recolectados empleando jeringas de succión y redes de acuario. Una vez capturados fueron separados e identificados usando las claves taxonómicas de Robertson et al. (2024) “Una guía para peces costeros del Pacífico Oriental Tropical”. Posteriormente, una muestra de la aleta pectoral derecha de cada ejemplar de *H. adustus* y *H. nicholsi* fue extraída, preservada en alcohol absoluto y almacenada a una temperatura de -76°C. Algunos ejemplares fueron fijados en formaldehído al 5% y conservados en alcohol etílico al 70%. Todos los organismos recolectados fueron debidamente etiquetados y depositados en la Colección Ictiológica del Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CPUM) con número de registro PEC-227-07-09. Para la captura de los peces se usaron los siguientes permisos: 013/2012 PNG (Ecuador), PPF/DGOPA-035/15, PPF/DGOPA-065/21 y PPF/DGOPA-085/22, PPF/DGOPA-262/17 (México), 78-Panamá (Panamá), R056-2015-OT-CONAGEBIO (Costa Rica), MARN-AIMA-004-2013 (El Salvador).

2.2 Análisis molecular

2.2.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de 59 individuos de *Halichoeres adustus* y 94 individuos de *H. nicholsi*, para el gen mitocondrial de la subunidad 1 del citocromo oxidasa (*cox1*). Del total de individuos de *H. adustus*, 30 individuos fueron usados para el gen nuclear miosina (*Myo*) y 39 individuos para el gen rodopsina (*Rho*). De los 94 individuos de *H. nicholsi*, se utilizaron 39 individuos para el gen *Rho*. El método utilizado para la extracción de ADN fue el propuesto por Sambrook et al. (1989), como “fenol-cloroformo” que consiste en la capacidad de ambos compuestos para separar los ácidos nucleicos de otros componentes celulares, mediante la ruptura de la membrana celular, la eliminación de proteínas y la purificación del ADN.

2.2.2 Amplificación de genes

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para amplificar fragmentos específicos de los marcadores elegidos. Las reacciones se realizaron con un volumen de 12.5 µL con los siguientes reactivos: 7.22 µL de agua ultrapura, 1.25 µL de amortiguador 5x, 0.47 µL de MgCl₂, 0.5 µL de

cada cebador, 0.5 μ L DNTPs, 0.1 μ L de Taq polimerasa, 1 μ L de BSA y 1 μ L de ADN y con las siguientes condiciones: temperaturas de desnaturalización de 5 min a 95 °C, con 35 ciclos de 30 s (desnaturalización), 30 s a 54 °C (alineamiento), 45 s a 72 °C, (extensión) y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos obtenidos fueron sometidos a una revisión mediante gel de agarosa al 1.5 % mediante electroforesis y visualizados en una cámara transiluminador UV. Por último, al finalizar la electroforesis, las muestras positivas fueron preparadas y enviadas para su secuenciación en MacroGen Sequencing Inc, en Seúl, Corea del Sur, para llevar a cabo los siguientes análisis.

2.3 Análisis de datos

Una vez obtenidas las secuencias de ADNmt y ADNn, se procedió a su alineación manual utilizando el software MEGA11 -*Molecular evolutionary genetics analysis versión 11*-. Para garantizar la precisión y la integridad de los datos, se eliminaron cada extremo anterior y posterior del alineamiento. Posteriormente, se llevó a cabo una revisión detallada mediante una búsqueda en BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* dentro de la base de datos de GenBank que ofrece el NCBI -*National Center for Biotechnology Information*, para confirmar la identidad de las secuencias y asegurar que correspondieran específicamente a las especies bajo estudio. Este proceso de validación es fundamental para garantizar la fiabilidad de los resultados. Para la revisión de las secuencias que presentaban deleciones, se construyó un alineamiento manual en MEGA11. Además, para verificar la calidad de las secuencias obtenidas, se realizaron revisiones detalladas en los cromatogramas correspondientes, con el propósito de identificar y corregir cualquier error en la secuenciación. Finalmente, para inferir haplotipos a partir de datos de secuencias de genotipos diploides en los genes nucleares, se utilizó el módulo PHASE v.2.0 (Stephens y Donnelly, 2003) integrado en el software DNAsp v.5.0 (Librado y Rozas, 2009).

2.3.1 Índices de diversidad genética

Se calculó la diversidad genética de los marcadores de ADNmt y ADNn para cada población de las cuatro provincias biogeográficas: Cortés, Mexicana, Panámica y Galápagos (Hasting, 2000); además se incluyeron como áreas independientes a las islas del archipiélago de Revillagigedo e Isla del Coco. Se determinó el número de haplotipos (H_n), la diversidad haplotípica (H_d), la diversidad nucleotídica (π), (Nei, 1987), y el número de sitios polimórficos (S), utilizando el software DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009).

2.3.2 Red de haplotipos

Se elaboró una red de haplotipos de cada gen y de las dos especies: *Halichoeres adustus* y *H. nicholsi* mediante el software POPART 1.7 (Leigh y Bryant, 2015). Se utilizó el método de Median-Joining, que implementa distancias génicas a través de Máxima Parsimonia, para inferir las relaciones genéticas entre secuencias intraespecíficas *-bajos niveles de divergencia-*, dentro de una red reticular de conexiones (Bandelt, et al., 1999).

2.3.3 Diferenciación genética

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se llevó a cabo en diferentes niveles jerárquicos para estimar el porcentaje de variación genética entre grupos, entre las poblaciones dentro de grupos y dentro de las poblaciones. Estas fueron agrupadas en tres componentes: 1) todos los individuos como población Panmítica 2) dos grupos de acuerdo con la formación de los haplogrupos y 3) grupos basados en las provincias biogeográficas e islas del PTO (Hastings, 2000). La diferenciación genética se evaluó mediante índices de fijación: Φ_{ST} entre poblaciones, Φ_{CT} entre grupos y Φ_{SC} entre subpoblaciones dentro de los grupos: se obtuvo el índice de fijación pareadas de Φ_{ST} junto con sus valores de significancias para los estadísticos F (Wright, 1931), con el fin de analizar el patrón geográfico de subdivisión poblacional y medir la diferenciación genética de las poblaciones, este análisis se realizó a través de 1,000 permutaciones.

2.3.4 Distancias genéticas

Las distancias genéticas entre las provincias y regiones insulares del PTO y conforme a la formación de los grupos genéticos, se calcularon utilizando el software MEGA11 y con el método de distancias patrísticas no corregidas (*p distance %*) (Tamura et al., 2013). Esto permite calcular distancias genéticas entre los grupos genéticos, midiendo el grado de divergencia entre secuencias a través de la proporción (p) de sitios nucleotídicos en donde dos secuencias difieren (Nei y Kumar, 2000). Además, se analizó la relación entre la distancia geográfica y genética entre las localidades muestreadas mediante una prueba de Mantel. Esta prueba se basó en la distancia genética estandarizada de Rousset ($F_{ST}/1-F_{ST}$) y la distancia geográfica lineal (en kilómetros) entre cada localidad. La prueba de Mantel se evaluó mediante 99,999 permutaciones. Finalmente, para visualizar posibles aislamientos por distancia, se representaron gráficamente con un gráfico de correlación utilizando el software Rstudio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Universo muestral

Se extrajo ADN genómico de 59 individuos de *Halichoeres adustus* recolectados en la provincia Mexicana y Panámica e Isla del Coco. Se obtuvieron 57 secuencias para el gen *cox1* con una longitud de 580 pb, 29 secuencias para el gen *Rho* con una longitud de 839 pb, y 18 secuencias para el gen *Myo* con una longitud de 739 pb. Para *H. nicholsi* se extrajo ADN genómico de 94 individuos, obteniéndose 88 secuencias del gen *cox1* con una longitud total de 591 pb, y 30 secuencias del gen *Rho* con una longitud de 730 pb. No se pudieron obtener secuencias para el gen *Myo* en esta especie.

3.1.1 Diversidad genética

El gen mitocondrial *cox1*, presentó en general alta diversidad genética en *Halichoeres adustus* y *H. nicholsi*, reflejando una alta diversidad haplotípica de $Hd = 0.82$ en *H. adustus* y $Hd = 0.74$ en *H. nicholsi*, pero una baja diversidad nucleotídica $-\pi = 0.00630$ en *H. adustus* y $\pi = 0.00169$ en *H. nicholsi*-. Se identificaron 16 sitios polimórficos en *H. adustus* y 14 en *H. nicholsi*. Para *H. adustus*, el valor más alto de diversidad haplotípica se obtuvo en la provincia Panámica ($Hd = 0.80$), mientras que el valor más bajo de diversidad haplotípica se obtuvo en la provincia Mexicana ($Hd = 0.53$). En *H. nicholsi* el valor más bajo de diversidad haplotípica se obtuvo en el archipiélago de Revillagigedo con $Hd = 0.21$ y la provincia de Galápagos y Mexicana presentaron los valores más alto de diversidad haplotípica ($Hd = 0.69$). Ambas especies presentaron una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0063$ a 0.00038) (Tabla 1) dentro de las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.

Los genes nucleares mostraron una diversidad genética similar al gen mitocondrial *cox1*. En *H. adustus*, el gen *Myo* presentó 13 sitios polimórficos y el gen *Rho*, 26 sitios polimórficos. La diversidad haplotípica fue alta para ambos genes $-Hd = 0.82$ para *Myo* y $Hd = 0.74$ para *Rho*-, mientras que la diversidad nucleotídica fue baja ($\pi = 0.0063 \pm 0.0023$). Analizando las diferentes provincias y regiones insulares del PTO para el gen *Myo*, se observó que la provincia Mexicana presentó el valor más alto de diversidad haplotípica ($Hd = 0.96$). Mientras para el gen *Rho*, la provincia Panámica mostró el valor más alto de diversidad haplotípica ($Hd = 1.00$) (Tabla 1). En *H. nicholsi* el gen *Rho*, presentó 23 sitios polimórficos, con una diversidad

haplotípica de $H_d=0.52$ y diversidad nucleotídica de $\pi= 0.00203$. La provincia biogeográfica con la mayor diversidad haplotípica fue la provincia Mexicana ($H_d=0.68$) y la más baja fue la provincia de Galápagos ($H_d=0.20$) (Tabla 1).

Tabla 1. Diversidad genética de *H. adustus* y *H. nicholsi* en las provincias del PTO, basadas en secuencias del gen mitocondrial *cox1* y en los genes nucleares *Rho* y *Myo*, obteniendo el número de secuencias (n), número de haplotipos (Hn), la diversidad haplotípica (H_d), la diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987) y el número de sitios polimórficos (S).

Provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO	<i>H. adustus</i>					<i>H. nicholsi</i>				
	n	Hn	H_d	π	S	n	Hn	H_d	π	S
<i>cox1</i>										
Provincia de Cortés	*	*	*	*	*	11	3	0.47	0.00086	2
Provincia Mexicana	16	5	0.53	0.00164	5	13	5	0.69	0.00165	4
Provincia Panámica	9	4	0.80	0.00201	3	13	4	0.60	0.00117	3
Provincia de Galápagos	SS	SS	SS	SS	SS	24	8	0.69	0.00163	8
Archipiélago de Revillagigedo	SS	SS	SS	SS	SS	27	4	0.21	0.00038	3
Isla del Coco	32	9	0.56	0.00196	11	SS	SS	SS	SS	SS
NT	57	16	0.82	0.00630	16	88	15	0.74	0.00169	14
<i>Rho</i>										
Provincia de Cortés	*	*	*	*	*	10	5	0.66	0.00215	9
Provincia Mexicana	16	5	0.53	0.00114	5	12	4	0.68	0.00336	7
Provincia Panámica	4	4	1.00	0.00440	6	12	4	0.45	0.00184	6
Provincia de Galápagos	SS	SS	SS	SS	SS	10	2	0.20	0.00095	4
Archipiélagos de Revillagigedo	SS	SS	SS	SS	SS	16	4	0.35	0.00058	3
Isla del Coco	38	10	0.46	0.00149	17	SS	SS	SS	SS	SS
NT	58	19	0.74	0.00226	26	60	13	0.52	0.00203	23
<i>Myo</i>										
Provincia de Cortés	*	*	*	*	*	SS	SS	SS	SS	SS
Provincia Mexicana	14	10	0.96	0.00683	11	SS	SS	SS	SS	SS
Provincia Panámica	6	4	0.80	0.00525	9	SS	SS	SS	SS	SS
Provincia de Galápagos	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Archipiélagos de Revillagigedo	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Isla del Coco	16	2	0.13	0.00017	1	SS	SS	SS	SS	SS
NT	36	16	0.82	0.00626	13					

NT= número total, *cox1* = Citocromo oxidasa I, *Rho* = Rodopsina, *Myo* = Miosina, SS= Sin muestras, *= No habita en esta zona

3.1.2 Red de haplotipos

Los resultados de la red de haplotipos en *cox1* para *H. adustus*, mostraron 16 haplotipos organizados en tres haplogrupos con estructura geográfica. Los individuos de Isla del Coco -a excepción de uno- forman un haplogrupo separados por cuatro pasos mutacionales del haplogrupo más cercano (Figura 3a), el cual está conformado por todos los organismos de la provincia Panámica, más uno de la Isla del Coco y uno de

la provincia Mexicana. Este haplogrupo está separado por un paso mutacional de un haplogrupo que incluye al resto de las secuencias de la provincia Mexicana (Figura 3a). Para los genes nucleares, se identificaron un total de 19 haplotipos del gen *Rho* (Figura 3b) y 16 haplotipos del gen *Myo* (Figura 3c). Se observó la segregación de las muestras de la Isla del Coco separándose por uno (*Rho*) y tres (*Myo*) pasos mutacionales. Para las muestras de las provincias Mexicana y Panámica, aunque no se observó mezcla de haplotipos, no existe un patrón de segregación geográfica.

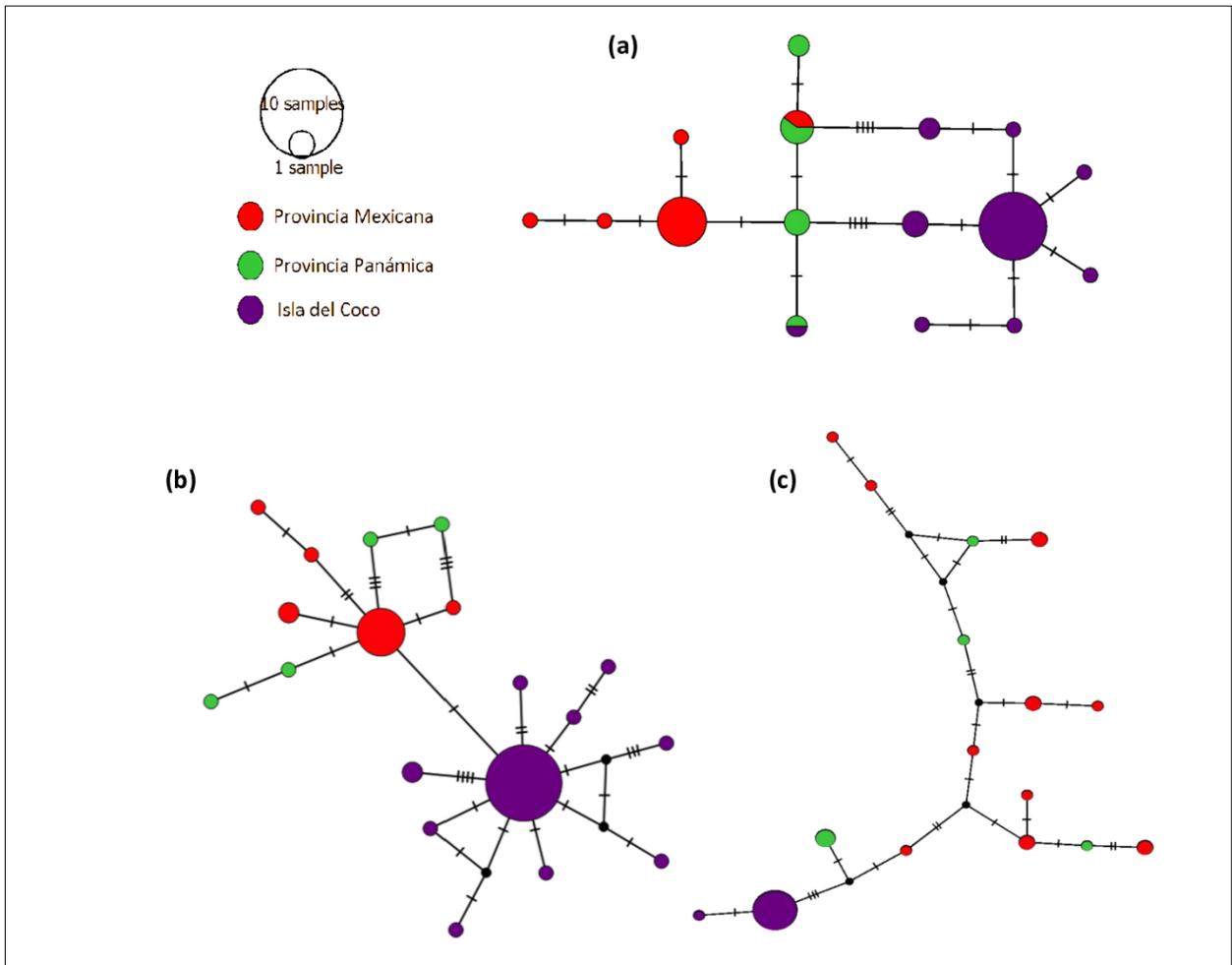


Figura 3. Red de haplotipos de *Halichoeres adustus* (Gilbert, 1890), donde (a) es del gen *cox1*, (b) del gen *Rho* y (c) del gen *Myo*. El tamaño de los círculos corresponde a la frecuencia de cada haplotipo de acuerdo a la imagen adjunta y los colores representan las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO (Hastings, 2000). Las líneas transversales corresponden a los pasos mutacionales.

La red de haplotipos del gen mitocondrial *cox1* para *H. nicholsi* resultó en 15 haplotipos, en donde se observó la formación de dos grupos geográficamente segregados y separados por un paso mutacional. El primer grupo genético incluye individuos del archipiélago de Revillagigedo -15 secuencias de Isla Clarión +

12 secuencias de Isla Socorro-, los cuales no comparten haplotipos con las demás provincias del PTO. El segundo grupo genético está compuesto por individuos de las otras provincias del PTO -provincias: Panamá, Cortés, Galápagos y Mexicana-, la mayoría de los cuales se agrupan en un haplotipo central (Figura 4a). La red de haplotipos del gen *Rho* resultó en 13 haplotipos, los cuales se encuentran distribuidos y compartidos entre todas las provincias biogeográficas y el archipiélago de Revillagigedo. La mayoría de estos haplotipos pertenecen a un haplotipo central. La mayoría de las muestras de la provincia Mexicana muestra cierta segregación en dos grupos periféricos (Figura 4b).

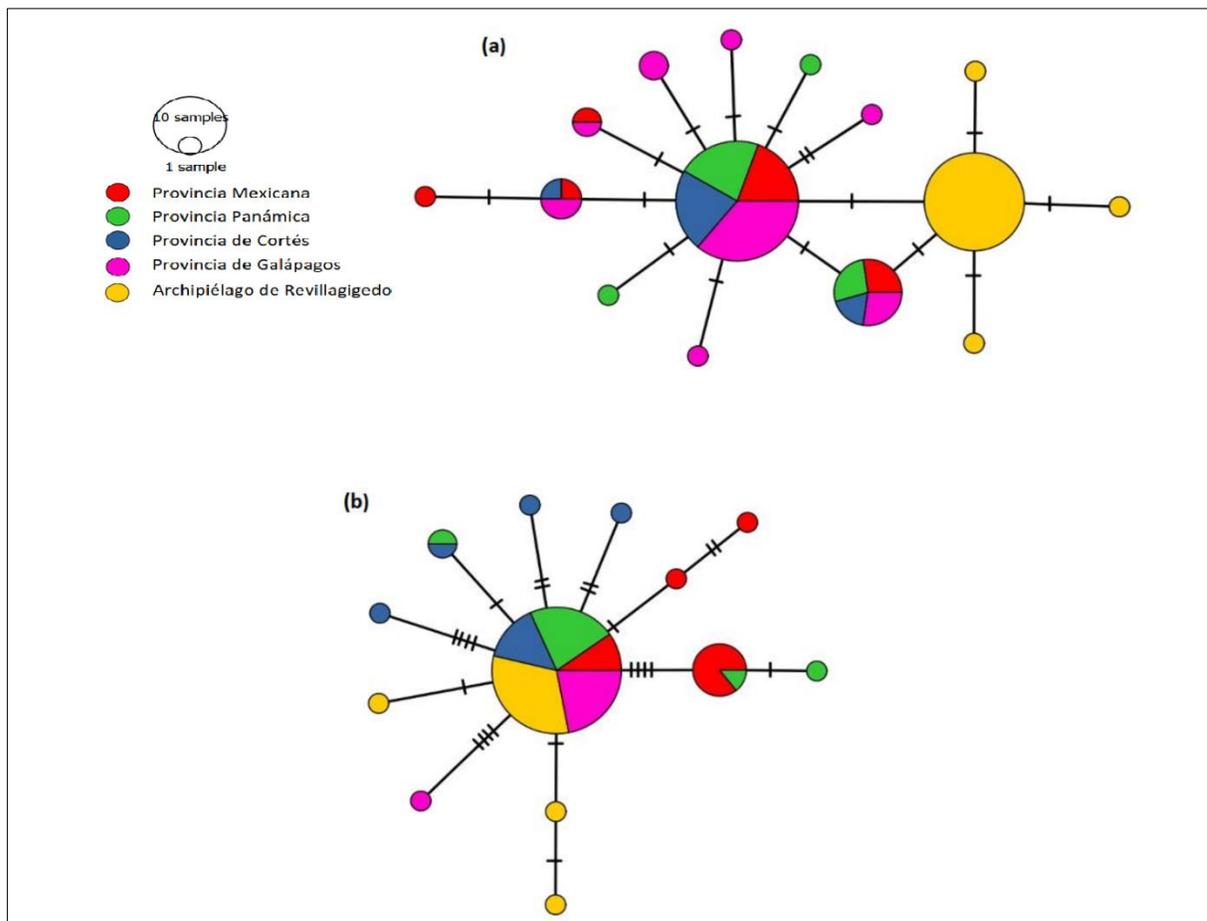


Figura 4. Red de haplotipos de *Halichoeres nicholsi* (Jordan y Gilbert, 1882) donde (a) es del gen *cox1* y (b) del gen *Rho*. El tamaño de los círculos corresponde a la frecuencia de cada haplotipo de acuerdo a la imagen adjunta y los colores representan las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO (Hastings, 2000). Las líneas trasversales corresponden a los pasos mutacionales.

3.1.3 Diferenciación genética

La AMOVA para las tres agrupaciones realizadas, muestran patrones distintos de variación genética en *H. adustus* y *H. nicholsi*. En la primera agrupación, en donde se consideraron a todas las poblaciones como

una población panmítica, se encontró una estructura genética significativa entre las poblaciones para los tres genes en *H. adustus*: *cox1* -20.05%, $\Phi_{ST}=0.79$, $p < 0.05$ -, *Myo* -45.86%, $\Phi_{ST}=0.54$, $p < 0.05$ - y *Rho* -52.39%, $\Phi_{ST}=0.47$, $p < 0.05$ - y de la misma manera para *H. nicholsi* en *cox1* (58.06%, $\Phi_{ST}=0.41$, $p < 0.05$), sin embargo en el gen *Rho* se presentó un valor bajo de $\Phi_{ST}=0.19$ (80.91% $p < 0.05$) y no significativo (Tabla 2 y 3). Para la segunda agrupación basada en la formación de haplogrupos, se observó la mayor variación genética entre grupos en *H. adustus* en los genes *cox1*, 66.34% ($\Phi_{CT}=0.66$, $p > 0.05$) y *Myo* de 50.56% ($\Phi_{CT}=0.50$, $p > 0.05$) y en *H. nicholsi* para *cox1* de 51.67% ($\Phi_{CT}=0.51$, $p > 0.05$). Sin embargo, en el caso del gen *Rho* en *H. adustus*, la mayor variación genética se encontró dentro de las poblaciones -51.98%, $\Phi_{ST}=0.48$, $p < 0.05$ - siendo este último resultado estadísticamente significativo. En la última agrupación en donde las poblaciones se organizaron de acuerdo a las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO, la mayor variación genética se encontró entre grupos para *H. adustus* en *cox1* -89.33%, $\Phi_{CT}=0.89$, $p > 0.05$ - y *Myo* -58.46%, $\Phi_{CT}=0.58$, $p > 0.05$ -; en cambio en *Rho* la mayor variación se encontró entre poblaciones/dentro de grupos -76.55%, $\Phi_{SC}=0.62$, $p < 0.05$ - siendo este último estadísticamente significativo. En *H. nicholsi* en *cox1*, la mayor variación genética se encontró dentro de las poblaciones -54.55%, $\Phi_{ST}=0.45$, $p < 0.05$ - y en *Rho* entre poblaciones/dentro de grupos -80.04%, $\Phi_{SC}=0.53$, $p < 0.05$ - siendo en ambos casos estadísticamente significativo.

Para el gen mitocondrial *cox1*, el análisis de diferenciación genética pareada (Φ_{ST}) entre los haplogrupos para *H. adustus* tuvo valores de Φ_{ST} de 0.81 ($p < 0.05$) entre la Isla del Coco vs provincias continentales (Mexicana y Panámica), mientras que en *H. nicholsi*, los valores entre el archipiélago de Revillagigedo vs las demás provincias del PTO fueron de 0.56 ($p < 0.05$), estos resultados fueron estadísticamente significativos para ambas especies (Tabla 4 y 6). Los valores de Φ_{ST} pareadas entre las diferentes provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO, fueron entre 0.48 y 0.82 en *H. adustus* y de 0.73 en *H. nicholsi*. En *H. adustus* todas las comparaciones pareadas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En *H. nicholsi*, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativo para las comparaciones pareadas entre el archipiélago de Revillagigedo vs Cortés - $\Phi_{ST}=0.73$, $p < 0.05$ -, Mexicana - $\Phi_{ST}=0.64$, $p < 0.05$ -, Panámica - $\Phi_{ST}=0.68$, $p < 0.05$ - y Galápagos - $\Phi_{ST}=0.61$, $p < 0.05$ -. En *H. adustus*, el valor de Φ_{ST} más bajo se observó entre las provincias Panámica vs Mexicana - $\Phi_{ST}=0.48$, $p < 0.05$ -, mientras que el más alto fue entre Isla del Coco vs Mexicana - $\Phi_{ST}=0.82$, $p < 0.05$ -, siendo estadísticamente significativo en ambos casos (Tabla 4). Para *H. nicholsi*, el valor más bajo fue entre las provincias Panámica vs Galápagos - $\Phi_{ST}=0.006$, $p > 0.05$ - y el más alto fue entre el archipiélago de Revillagigedo vs Cortés - $\Phi_{ST}=0.53$, $p < 0.05$ -, siendo este último estadísticamente significativo (Tabla 6). Para los loci nucleares, el análisis de diferenciación genética pareada (Φ_{ST}) entre los haplogrupos para *H. adustus* del gen *Myo*, fue de 0.58 ($p < 0.05$) entre la Isla del Cocos vs provincias del PTO, y para el gen *Rho* los valores entre Isla del Cocos vs

Provincias del PTO fue de 0.53 ($p < 0.05$). Los valores de Φ_{ST} pareados entre las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO fueron entre 0.05 y 0.75 (*Myo*) y de 0.39 a 0.57 (*Rho*). En *Myo* los valores más bajos fueron entre las provincias Panamá vs Mexicana ($\Phi_{ST}=0.05$) y el valor más alto entre Isla del Coco vs Panamá ($\Phi_{ST}=0.75$, $p < 0.05$) siendo este último estadísticamente significativo. Para *Rho*, el valor más bajo fue entre las provincias Mexicana vs Panamá ($\Phi_{ST}=0.39$, $p > 0.05$ -) y el más alto fue entre Isla del Cocos vs Mexicana ($\Phi_{ST}=0.57$, $p < 0.05$ -), siendo este último resultados estadísticamente significativo (Tabla 4). En *H. nicholsi*, los valores de Φ_{ST} pareados entre las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO del gen *Rho*, fue de 0.02 a 0.32, siendo estadísticamente significativos los valores de Φ_{ST} pareados entre la provincia Mexicana vs Archipiélago de Revillagigedo ($\Phi_{ST}=0.39$, $p < 0.05$ -), *Cortés* ($\Phi_{ST}=0.27$, $p < 0.05$ -) y *Galápagos* ($\Phi_{ST}=0.32$, $p < 0.05$ -).

Tabla 2. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para muestras de *H. adustus* que prueban tres agrupaciones: (1) todos los individuos como población Panmítica (2) dos grupos de acuerdo a la formación de los haplogrupos (3) grupos basados en las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.

Grupos	Descripción	Fuentes de variación	% de variación	Índices de fijación	P-value		
		Entre grupos	-	-	-		
<i>cox1</i>	1	Isla del Coco + Panamá + Mexicana	Entre poblaciones/dentro de grupos	79.95	-	-	
		Dentro de las poblaciones	20.05	$\Phi_{ST}=0.79$	$p < 0.05$		
	2	Isla del Coco/Panamá + Mexicana	Entre grupos	66.39	$\Phi_{CT}=0.66$	Ns	
			Entre poblaciones/dentro de grupos	15.59	$\Phi_{SC}=0.46$	$p < 0.05$	
		3	Isla del Coco/Panamá/Mexicana	Dentro de las poblaciones	18.02	$\Phi_{ST}=0.81$	$p < 0.05$
				Entre grupos	89.33	$\Phi_{CT}=0.89$	Ns
		Entre poblaciones/dentro de grupos	-9.73	$\Phi_{SC}=-0.91$	Ns		
		Dentro de las poblaciones	20.4	$\Phi_{ST}=0.79$	$p < 0.05$		
<i>Myo</i>	1	Isla del Coco + Panamá + Mexicana	Entre grupos	-	-	-	
			Entre poblaciones/dentro de grupos	54.14	-	-	
		2	Isla del Coco /Panamá + Mexicana	Dentro de las poblaciones	45.86	$\Phi_{ST}=0.54$	$p < 0.05$
				Entre grupos	50.56	$\Phi_{CT}=0.50$	Ns
		3	Isla del Coco /Panamá/Mexicana	Entre poblaciones/dentro de grupos	8.4	$\Phi_{SC}=-0.16$	Ns
				Dentro de las poblaciones	41.04	$\Phi_{ST}=0.58$	$p < 0.05$
		Entre grupos	58.46	$\Phi_{CT}=0.58$	Ns		
		Dentro de las poblaciones	47.17	$\Phi_{ST}=0.52$	$p < 0.05$		
<i>Rho</i>	1	Isla del Coco +Panamá +Mexicana	Entre grupos	-	-	-	
			Entre poblaciones/dentro de grupos	47.61	-	-	
		2	Isla del Coco/Panamá +Mexicana	Dentro de las poblaciones	52.39	$\Phi_{ST}=0.47$	$p < 0.05$
				Entre grupos	10.13	$\Phi_{CT}=0.10$	Ns
		3	Isla de Cocos /Panamá /Mexicana	Entre poblaciones/dentro de grupos	37.39	$\Phi_{SC}=0.42$	$p < 0.05$
				Dentro de las poblaciones	51.98	$\Phi_{ST}=0.53$	$p < 0.05$
		Entre grupos	-22.86	$\Phi_{CT}=-0.22$	Ns		
		Dentro de las poblaciones	76.55	$\Phi_{SC}=0.62$	$p < 0.05$		
		Dentro de las poblaciones	46.32	$\Phi_{ST}=0.53$	$p < 0.05$		

cox1 = Citocromo oxidasa I, *Rho* = Rodopsina, *Myo* = Miosina. Ns= No significativo y $p < 0.05$ estadísticamente significativo.

Tabla 3. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para muestras de *H. nicholsi* que prueban tres agrupaciones: (1) todos los individuos como población Panmítica (2) dos grupos de acuerdo a la formación de los haplogrupos (3) grupos basados en las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.

Grupos	Descripción	Fuentes de Variación	% de variación	Índices de fijación	P-value
cox1	1 Revillagigedo + Cortés + Mexicana + Galápagos + Panamáica	Entre grupos	-	-	-
		Entre poblaciones/dentro de grupos	41.94	-	-
		Dentro de las poblaciones	58.06	$\Phi_{ST} = 0.41$	$p < 0.05$
	2 Revillagigedo/Cortés + Mexicana + Galápagos + Panamáica	Entre grupos	51.67	$\Phi_{CT} = 0.57$	Ns
		Entre poblaciones/dentro de grupos	-0.69	$\Phi_{SC} = -0.01$	Ns
		Dentro de las poblaciones	43.02	$\Phi_{ST} = 0.56$	$p < 0.05$
5	Revillagigedo/Cortés /Mexicana/ Galápagos/Panamíaica	Entre grupos	37.45	$\Phi_{CT} = 0.37$	$p < 0.05$
		Entre poblaciones/dentro de grupos	8	$\Phi_{SC} = 0.12$	$p < 0.05$
		Dentro de las poblaciones	54.55	$\Phi_{ST} = 0.45$	$p < 0.05$
Rho	1 Revillagigedo + Cortés + Mexicana + Galápagos + Panamáica	Entre grupos	-	-	-
		Entre poblaciones/dentro de grupos	19.09	-	-
		Dentro de las poblaciones	80.91	$\Phi_{ST} = 0.19$	$p < 0.05$
	5 Revillagigedo/Cortés/ Mexicana/ Galápagos/Panamíaica	Entre grupos	-49.22	$\Phi_{CT} = -0.49$	Ns
		Entre poblaciones/dentro de grupos	80.04	$\Phi_{SC} = 0.53$	$p < 0.05$
		Dentro de las poblaciones	69.19	$\Phi_{ST} = 0.30$	$p < 0.05$

cox1 = Citocromo oxidasa I, *Rho* = Rodopsina, *Myo* = Miosina. Ns= No significativo y $p < 0.05$ estadísticamente significativo.

3.1.4 Distancias genéticas

En *H. adustus*, para las distancias genéticas (*p distance* %) entre las provincias continentales -*Mexicana* y *Panamáica*- vs Isla del Coco, se obtuvieron valores que van de 0.49% (*Rho*) a 1.06% (*cox1*). Estas distancias fueron superiores a las observadas entre la provincia Mexicana vs la Panámica, las cuales presentaron porcentajes de distancias más bajos en los genes muestreados que van desde 0.34% (*cox1*) a 0.64% (*Myo*). El gen *cox1* mostró la mayor distancia genética entre la Isla del Coco vs Mexicana, con un valor de 1.06% (Tabla 4). Las distancias genéticas por grupos genéticos presentaron valores que van de 0.30% (*Rho*) a 1.04% (*cox1*) para cada gen (Tabla 5).

Tabla 4. Valores de distancia genética (*p-distance* %) en *H. adustus* por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal entre las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.

Genes	Provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO	Mexicana	Panamáica	Isla del Coco
<i>cox1</i>	Mexicana	-	0.48	0.82
	Panamáica	0.34%	-	0.80
	Isla del Coco	1.06%	0.99%	-
<i>Rho</i>	Mexicana	-	0.39	0.46
	Panamáica	0.35%	-	0.57
	Isla del Coco	0.25%	0.49%	-
<i>Myo</i>	Mexicana	-	0.05	0.62
	Panamáica	0.64%	-	0.75
	Isla del Coco	0.89%	0.68%	-

Los valores en negrita representan el nivel de significancia $p < 0.05$.

Tabla 5. Valores de distancia genética por grupos genéticos (*p-distance* %) en *H. adustus* por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal.

Genes	Grupos genéticos	Isla del Coco	Provincias: Mexicana + Panamáica
<i>cox1</i>	Isla del Coco	-	0.81
	Provincias: Mexicana + Panamáica	1.04%	-
<i>Rho</i>	Isla del Coco	-	0.53
	Provincias: Mexicana + Panamáica	0.30%	-
<i>Myo</i>	Isla del Coco	-	0.58
	Provincias: Mexicana + Panamáica	0.83%	-

Los valores en negrita representan el nivel de significancia $p < 0.05$.

En *H. nicholsi*, para las distancias genéticas (*p distance %*) entre las provincias del PTO -Cortés, Mexicana, Panámica y Galápagos- vs el archipiélago de Revillagigedo presentaron valores que van de 0.20% a 0.25%. Estas distancias fueron superiores a las observadas entre las provincias del PTO que presentaron porcentajes más bajos que van desde 0.09% hasta 0.16% para el gen *cox1* (Tabla 6). Sin embargo, los resultados de *p distance %* para el gen *Rho* presenta los porcentajes más alto para la provincia Mexicana vs Cortés de 0.38%, Mexicana vs Revillagigedo de 0.30% y Mexicana vs Galápagos de 0.32% (Tabla 6). La distancia genética entre grupos genéticos -archipiélago de Revillagigedo vs provincias del PTO- fue de 0.23% (Tabla 7).

Tabla 6. Valores de distancia genética (*p-distance %*) en *H. nicholsi*, por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal entre las provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO.

Provincias biogeográficas y regiones insulares del PTO		Revillagigedo	Cortés	Mexicana	Panámica	Galápagos
<i>cox1</i>	Revillagigedo	-	0.73	0.64	0.68	0.61
	Cortés	0.20%	-	0.00	0.00	0.00
	Mexicana	0.23%	0.11%	-	0.00	0.00
	Panámica	0.21%	0.09%	0.13%	-	0.00
	Galápagos	0.25%	0.12%	0.16%	0.13%	-
<i>Rho</i>	Revillagigedo	-	0.03	0.39	0.07	0.02
	Cortés	0.13%	-	0.27	0.02	0.00
	Mexicana	0.30%	0.38%	-	0.12	0.32
	Panámica	0.12%	0.20%	0.29%	-	0.04
	Galápagos	0.07%	0.15%	0.32%	0.14%	-

Los valores en negrita representan $p < 0.05$. Los valores negativos fueron reemplazados por cero.

Tabla 7. Valores de distancia genética por grupos genéticos (*p-distance %*) en *H. nicholsi* por debajo de la diagonal y la diferenciación genética pareadas (Φ_{ST}) por encima de la diagonal.

Genes	Grupos genéticos	Revillagigedo	Provincias: Mexicana + Panámica + Galápagos + Cortés
<i>cox1</i>	Revillagigedo	-	0.56
<i>cox1</i>	Provincias: Mexicana + Panámica + Galápagos + Cortés	0.23%	-

Los valores en negrita representan el nivel de significancia $p < 0.05$.

La prueba de Mantel para el gen *cox1* en *H. adustus* mostró una correlación positiva $-r = 0.71$; $p = 0.20$ - entre las matrices de distancia genéticas y geográficas; sin embargo, la correlación observada no es estadísticamente significativa. En el caso de *H. nicholsi*, se obtuvo una correlación negativa muy débil $-r =$

-0.13; $p = 0.93$ - entre las matrices de distancia genéticas y geográficas (Figura 5). Para los genes nucleares de *H. adustus*, se realizaron pruebas de Mantel separadas, en donde el gen *Rho* $-r = -0.48, p=0.80$ - y el gen *Myo* $-r = -0.50, p = 0.83$ -, mostraron correlaciones negativas moderadas; sin embargo, ninguna de estas correlaciones fue estadísticamente significativa. En *H. nicholsi*, el gen rodopsina obtuvo una correlación negativa débil y no significativa entre las dos matrices ($r=-0.11$ y $p = 0.8$).

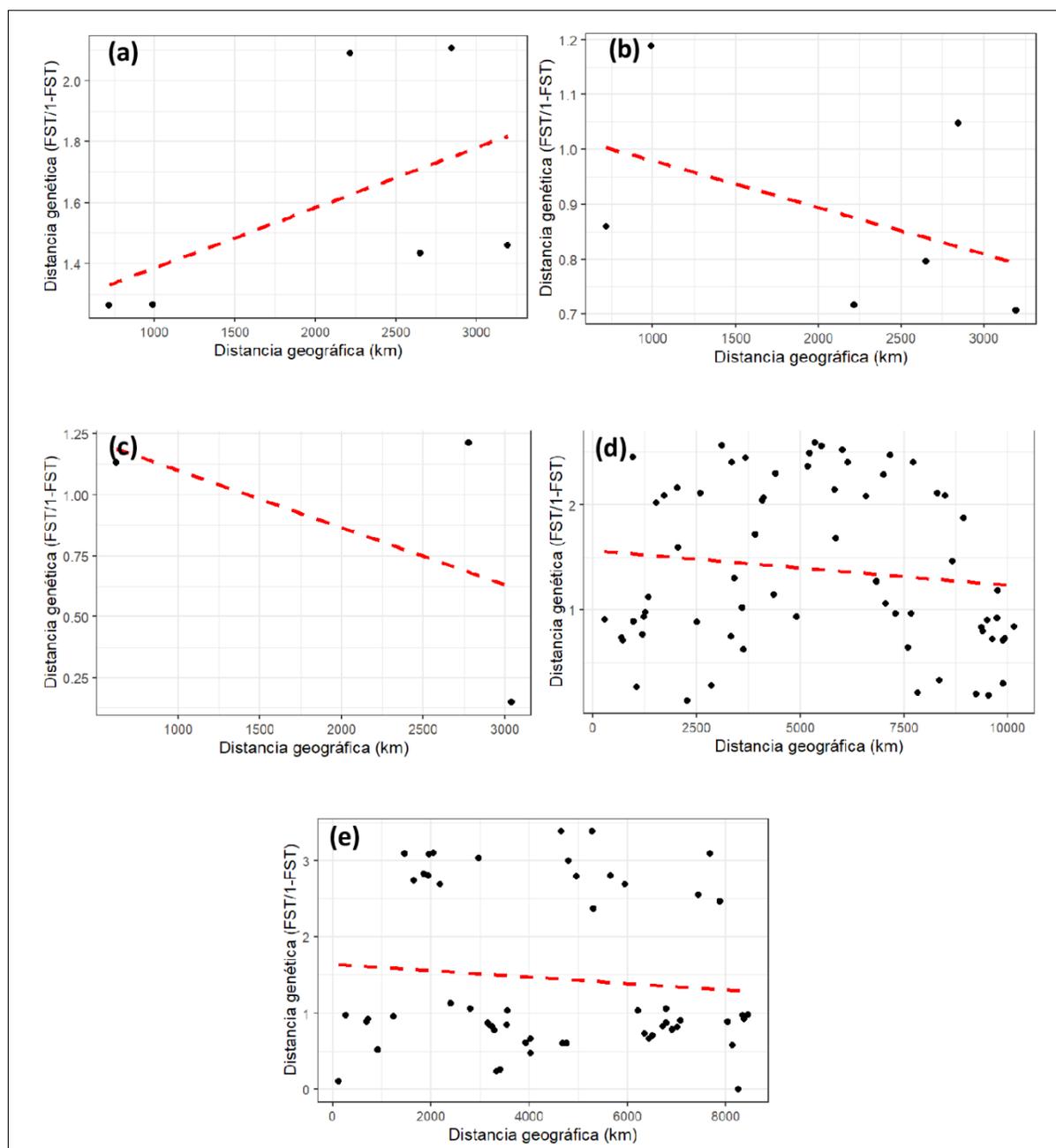


Figura 5. Asociación entre las distancias geográficas (km) y genéticas de Rousset (FST/1-FST) entre los individuos para ambas especies. *Halichoeres adustus*: (a) *cox1*, (b) *Rho*, y (c) con el gen *Myo*; *H. nicholsi*: (d) *cox1* y (e) *Rho*.

Capítulo 4. Discusión

El patrón filogeográfico encontrado en ambas especies muestra una historia evolutiva compleja. *Halichoeres adustus* presentó una mayor diferenciación genética-AMOVA, red de haplotipos, distancias genéticas y análisis de Φ_{ST} - entre los individuos de Isla del Coco con respecto a las provincias Mexicana y Panámica. Los genes, *cox1* (cuatro pasos), *Myo* (tres pasos) y *Rho* (un paso) estuvieron separados por pocos pasos mutacionales; patrón que fue respaldado en todos los análisis realizados y para cada uno de los genes analizados. Por su parte, *H. nicholsi* presentó una diferenciación genética en el archipiélago de Revillagigedo con respecto a las demás provincias del PTO, separada por un paso mutacional en el gen *cox1*, sin embargo, el gen rodopsina no siguió este patrón por mostrar homogeneidad genética entre las provincias continentales y regiones insulares (Figura 4b).

Estas diferencias entre el ADN mitocondrial y el ADN nuclear pueden atribuirse a las diferencias en las tasas de mutaciones, los cuales ya han sido documentado en estudios previos que han identificado el mismo patrón (Torres-Hernández et al., 2022; Palmerín-Serrano et al., 2021). Los genes mitocondriales se heredan únicamente a través de la línea materna y no recombinan, además, el tamaño efectivo poblacional del ADNmt suele ser menor, aproximadamente una cuarta parte del de los genes nucleares. Esta diferencia en el tamaño efectivo poblacional hace que el ADNmt sea más vulnerable a la deriva genética, resultando en una tasa de sustitución más alta en comparación con los genes nucleares (Vázquez-Domínguez et al., 2009; Avise et al., 1988). A diferencia de los loci nucleares autosómicos que poseen un N_e mayor debido a la herencia biparental, y por ello, los genes nucleares presentan una tasa de sustitución más lenta (Hare, 2001). Como consecuencia, se esperaría que la estructura filogeográfica sea menos pronunciada en los loci nucleares, ya que, bajo un modelo de evolución neutral, la deriva genética actúa cuatro veces más lento en los loci nucleares, provocando divergencia entre poblaciones aisladas a un ritmo más lento (Avise et al., 1988). Por lo tanto, el sorteo incompleto de linajes, influido por el mayor tamaño efectivo poblacional del ADNn, podría estar influyendo en las diferencias del grado de estructura genética encontrada entre los genes nucleares y mitocondriales aquí estudiados.

En este estudio se planteó que las poblaciones de *Halichoeres adustus* y *H. nicholsi* mostrarían una diferenciación genética en función a las barreras de hábitat del PTO, como las brechas arenosas de Centroamérica y Sinaloa, así como la brecha oceánica entre las Islas y el continente. Además, se planteó que la posible diferenciación genética podría estar influenciada por las características biológicas y

ecológicas de las especies, así como factores oceanográficos del PTO. Por lo tanto, a continuación, se discutirán los resultados obtenidos de cada uno de los objetivos de este estudio.

4.1 Diferenciación genética en islas oceánicas del PTO

La diversidad de hábitats, la historia del desarrollo del surgimiento del istmo de Panamá y la naturaleza dinámica de las condiciones oceanográficas en el PTO, tanto a nivel espacial como temporal, han fomentado el desarrollo de procesos evolutivos únicos en muchos organismos que componen la biota de esta región (Lessios y Baums, 2017; Duda y Lessios, 2009; Hurtado et al., 2010). En este contexto, la familia Labridae tiene su origen en el Archipiélago Indo-Australiano (65-33 m.a.) y su dispersión sucedió en ambas rutas, es decir, a través del Atlántico y Pacífico central hacia el PTO. Durante el Oligoceno (33-23 m.a.) y Mioceno (23-5 m.a.) se originaron especies de Labridae tanto en el Pacífico como en el Atlántico, e incluso hubo dispersión durante el Mioceno, y este flujo se vio interrumpido cuando se cerró el istmo de Panamá, durante el Plioceno (2.8 m.a.) (Cowman y Bellwood, 2013).

El género *Halichoeres* (Labridae) tiene su origen hace 4.2 millones de años en el PTO, una edad apenas superior a los 3.4 millones de años documentados en un extenso estudio de linajes del Indo-Pacífico (Wainwright et al., 2018; Hodge y Bellwood, 2015). Por lo tanto, las especies del género *Halichoeres* son evolutivamente complejas, representado por una rica diversidad genética y morfológica, resultado de adaptaciones a diferentes hábitats y presiones selectivas, lo que ha llevado a patrones de diferenciación y endemismo en diversas regiones del océano (Wainwright et al., 2018; Barber y Bellwood, 2005). Esta complejidad evolutiva es un reflejo de su historia biogeográfica y de los cambios ambientales que han influido en su distribución y diversidad a lo largo del tiempo (Wainwright et al., 2018; Barber y Bellwood 2005). Sin embargo, son escasos los estudios que incluyen a la estructura genética de las poblaciones de peces ampliamente distribuidos a lo largo del PTO y de estos, pocos estudios han incluido a las islas oceánicas del PTO; por lo tanto, comprender la diversidad genética y las dinámicas poblacionales en estos ecosistemas es crucial para la conservación y manejo de los recursos marinos.

Las diferencias en las poblaciones de Isla del Coco y el archipiélago de Revillagigedo pueden ser el resultado de una combinación de factores biológicos o ecológicos de las especies y oceanográficos del PTO. Los resultados del Test de Mantel respaldan esta idea, al mostrar que la diferenciación genética no está correlacionada con las distancias geográficas (Figura 5). Esto sugiere que la diferenciación observada en

H. adustus y en *H. nicholsi*, podría estar influenciada por barreras presentes del Pacífico Tropical Oriental, que a su vez podrían actuar conjuntamente con las características biológicas o ecológicas de las especies.

4.1.1 Isla del Coco

La Isla del Coco, es considerada una isla importante en términos biogeográficos por su aislamiento geográfico y su alta biodiversidad marina (Lizano, 2008). Debido a que se encontró diferenciación genética en esta isla, es necesario analizarla aquí por separado. Los resultados en *H. adustus*, concuerdan con investigaciones anteriores que han registrado diferenciación genética en las poblaciones de peces de Isla del Coco, como en *Stethojulis bandanensis* (Lessios y Baums, 2017) y *Gobiesox adustus* (Torres-Hernández et al., 2020) donde se observó una estructuración genética única.

La Isla del Coco está separada por una brecha oceánica de 690 km del archipiélago de Galápagos y de 500 km de la costa continental de Costa Rica (Lessios y Baums, 2017). Esta distancia, en conjunto con las condiciones biológicas o ecológicas, podrían limitar la capacidad de dispersión de *H. adustus*. Wainwright et al. (2018) señalan que en general la especie prefiere hábitats someros (0-5 metros de profundidad) en la zona intermareal de costas rocosas azotados por las olas. Es importante considerar que los autores en un estudio filogenético encontraron que *H. adustus* y *H. notospilus* forman un subclado, y que estas dos especies comparten preferencias por estos mismos hábitats someros. Además, la zona intermareal es muy dinámica, con condiciones ambientales temporales que cambian drásticamente en temperatura, oxígeno, salinidad y pH. Por lo tanto, las especies que prefieren este entorno, como *H. adustus*, deben ser capaces de adaptarse a estas condiciones fluctuantes, sugiriendo que parte de su desarrollo larvario puede ocurrir cerca de la costa. Sin embargo, esta preferencia por hábitats someros en zonas intermareales podría limitar su dispersión. Según Rocha et al. (2005) las especies de *Halichoeres* que están más especializada a un tipo de hábitat, tienden a mostrar divergencias genéticas entre regiones, lo cual indica que las ecorregiones no comparten larvas. Este patrón se ha documentado en otros taxones, en donde se ha documentado una correlación positiva entre la divergencia genética y el grado de especialización de hábitat (Lu y Bernatchez, 1999; Smith y Fujio, 1982). Bajo este contexto, la capacidad de dispersión de *H. adustus* podría estar restringida por la brecha oceánica, ya que las áreas oceánicas profundas, representarían una barrera geográfica natural para una especie que habita en aguas someras. Esto limita la posibilidad de que individuos se desplacen desde y hacia la Isla del Coco, reduciendo su capacidad de colonizar nuevos hábitats o mantener intercambio genético entre poblaciones.

Otros factores que pueden influir en la dispersión de peces arrecifales, y en consecuencia en la diferenciación genética entre las poblaciones, son los procesos oceanográficos. Los giros ciclónicos y anticiclónicos junto con las corrientes, desempeñan un papel crucial en los ecosistemas marinos del PTO (Torres-Hernández et al., 2009). De manera particular, Isla del Coco está influenciado por el Domo de Costa Rica, un giro anticiclónico que se forma de manera estacional, con una estructura semi-permanente generalmente centrada cerca de 9°N, 88°O (Robertson et al., 2024). Esta circulación anticiclónica permite que las larvas pelágicas sean retenidas o concentradas en sus alrededores, aumentando las posibilidades de que se establezcan y crezcan antes de ser transportadas a otras áreas (Contreras et al., 2012; Pantoja et al., 2012; Aceves et al., 2004). Torres-Hernández et al. (2009) en un trabajo con *G. adustus* sugieren que estas características oceanográficas (giros anticiclónicos) influyen en la limitación del flujo genético entre las poblaciones de Isla del Coco y el continente, limitando la dispersión. Por lo tanto, es posible que estas mismas características, restrinjan aún más el intercambio de organismos de *H. adustus* entre el continente y la Isla del Coco. Aunque la duración de la fase larvaria pelágica (38 días), que generalmente está relacionada con la distancia geográfica recorrida antes del asentamiento (Víctor y Wellington, 2000) podría ser un factor importante, no es suficiente para explicar la dispersión de *H. adustus*. Por lo tanto, factores adicionales como las características oceanográficas, pueden estar influyendo en la dispersión.

Por otro lado, la diferenciación genética observada en la Isla del Coco (Figura 3, Tabla 2 y Tabla 4) podría verse exacerbada por una mayor influencia de la deriva genética, debido a que *H. adustus* presenta una baja abundancia ecológica. Esta baja abundancia ecológica fue documentada por Tholan et al. (2020) quienes realizaron una investigación en la Reserva de la Biosfera Islas Marías, México, y con la finalidad de establecer datos ecológicos y de abundancia de los peces de esta ANP. Realizaron monitoreos mediante el uso de video subacuático remoto con carnada en profundidades entre 0 a 40 m y determinaron que 58 especies tuvieron baja abundancia, entre ellos *Halichoeres adustus*. Es importante destacar que estudios realizados en otras áreas del Pacífico Tropical Oriental no han reportado la presencia de esta especie (; Laínez y Paúl 2019; Castellanos-Galindo et al., 2010; Espinoza y Salas, 2005); por lo tanto, se sugiere que *H. adustus* podría tener una baja abundancia ecológica en general. Esto puede abonar a la explicación del patrón observado en la red de haplotipos de esta especie (Figura 3), en donde la baja abundancia ecológica indicada por Tholan et al. (2020) podría aumentar la susceptibilidad a la deriva genética tras un cuello de botella. Además, es importante considerar que las barreras biogeográficas podrían impedir la dispersión de las especies, y favorecer el aislamiento de poblaciones (Lessios y Baums, 2017). Por lo tanto, una población aislada y con un tamaño poblacional reducido podría presentar un pool génico bajo, después de un evento de cuello de botella, y los alelos deletéreos podrían acumularse de manera más rápida. Lo anterior se debe a que, en poblaciones pequeñas, la selección natural es poco eficiente para eliminar estos

alelos, a diferencia de las poblaciones grandes, en donde la selección natural es más efectiva, eliminando a individuos con mayor carga genética (Lynch, 1993). Por lo tanto, el tamaño poblacional influye en la fuerza en la que la deriva genética actúa, permitiendo que esta última tenga un efecto más pronunciado en poblaciones pequeñas, lo que podría acentuar la diferenciación genética.

Finalmente, la diferenciación genética observada en el haplogrupo de Isla del Coco en *H. adustus*, se atribuye a la brecha oceánica que constituye una barrera geográfica natural debido a la preferencia de esta especie a hábitats someros. Estas características restringen el movimiento de los individuos hacia y desde la Isla del Coco, así como al Domo de Costa Rica, que favorece la retención larval. Además, la baja abundancia de esta especie, hace que la deriva genética tenga un efecto más pronunciado, exacerbando esta diferenciación genética. En conjunto, estas características biológicas y ecológicas afectan las posibilidades de dispersión desde y hacia la Isla del Coco.

4.1.2 Archipiélago de Revillagigedo

En el caso de *H. nichosi*, muestra homogeneidad genética entre las provincias continentales y en el archipiélago de Galápagos; sin embargo, muestra diferenciación genética entre las provincias continentales y archipiélago de Galápagos e islas del archipiélago de Revillagigedo (Tabla 3, Figura 4). Este patrón se observó sólo para el gen mitocondrial *cox1* y no en el nuclear *Rho*. No obstante, las posibles diferencias entre los patrones observados y los tiempos de coalescencia en ambos marcadores ya se explicaron en párrafos anteriores.

El archipiélago de Revillagigedo está separado del continente por una brecha oceánica, entre aproximadamente 400 km (Isla San Benedicto) al suroeste del extremo sur de la Península Baja California y a 1000 km (Isla Clarión) al oeste de Cabo Corrientes, Jalisco (Lessios y Baums 2017). Este aislamiento es acentuado por la limitada influencia de las corrientes oceánicas -*La Corriente Ecuatorial del Norte en dirección hacia el oeste y la Corriente de California, que cuando alcanza la latitud de la Península de Baja California Sur, una porción de ella se desvía hacia el suroeste para conectarse con la Corriente Ecuatorial del Norte, aunque su ruta es parcialmente indirecta*- (Fiedler y Lavín, 2014; Kessler, 2006), siendo la corriente fría de California la que presenta la mayor influencia en esta región. Esta corriente está activa principalmente durante el invierno y se intensifica en el mes de abril cerca del archipiélago (León-Tejera et al., 1996), en donde la temperatura oscila entre los 13 °C en invierno y 20 °C en verano, alcanzando hasta 150 m de profundidad, con desplazamiento lento de entre 4 y 5 cm/s (Fiedler y Lavín 2014).

Considerando que *H. nicholsi* tiene una tolerancia media de temperatura de 25 °C (Froese y Pauly, 2024), su dispersión podría estar restringida por las condiciones térmicas de la corriente de California, así como por el flujo lento. Según Kleypas et al. (1999), esta corriente representa una limitación importante, aunque no absoluta, para la distribución de la biota tropicales en el PTO, contribuyendo a la escasa introducción de organismos tropicales en esta región. La particularidad de esta corriente, junto con la limitada influencia de otras corrientes en Revillagigedo, puede reducir el transporte larval y restringir la capacidad de dispersión de *H. nicholsi* desde y hacia el archipiélago de Revillagigedo. A diferencia de las islas Galápagos, que, a pesar de estar separadas del continente por una brecha oceánica de 930 km al oeste de la costa de Ecuador, la corriente de Panamá facilita el intercambio de individuos entre el continente a las islas (viceversa). Esta corriente fluye hacia el suroeste desde el golfo de Panamá durante los meses de enero a abril, es una corriente cálida (oscila entre 24°C y 28°C) y llega de manera directa hacia el archipiélago de Galápagos (Robertson et al., 2024), lo que podría explicar la homogeneidad genética observada en las poblaciones de Galápagos.

La brecha oceánica que separa el archipiélago de Revillagigedo del continente, sumada con la influencia limitada de las corrientes oceánicas, actúan como una barrera efectiva para la dispersión en *H. nicholsi*. Estudios previos han señalado que estas brechas oceánicas actúan como barreras para la conectividad de especies, generando estructuras genéticas poblacionales en algunos peces de arrecifes (Torres-Hernández et al., 2022; Palmerín-Serrano et al., 2021; Sandoval et al., 2019; Lessios y Baums, 2017; Saarman et al., 2010; Lessios y Robertson, 2006; Hastings, 2000). En particular la diferenciación genética encontrada en el archipiélago de Revillagigedo en *H. nicholsi* concuerda con las observaciones realizadas en poblaciones del pez *Scorpaenodes xyris*, en donde se identificó que la brecha oceánica entre el archipiélago de Revillagigedo y la provincia de Cortés actúa como una barrera biogeográfica (Bernal-Hernández et al., 2024). Sin embargo, investigaciones recientes de Palmerín-Serrano et al. (2023) sugieren que la prolongada fase larval pelágica de entre uno y tres meses en algunos peces arrecifales, como *Stegastes faviatus*, *Plagiotremus azaleus* y *Hypsoblennius brevipinnis*, podría permitirles cruzar las barreras oceánicas que separan el continente de las islas del PTO. A pesar de ello, encontraron diferenciación genética en *H. brevipinnis* y *P. azaleus* en el archipiélago de Galápagos, lo que indica que, aunque las fases larvales más prolongadas pueden facilitar la dispersión, no garantizan la conectividad genética. Además, Victor (1987) registró un grupo de 31 larvas de lábridos en el océano abierto, ubicadas aproximadamente a 400 km al este de las Islas Galápagos, 500 km al sur de la Isla del Coco y 600 km al oeste de la Isla Malpelo y del continente. Es notable que estas larvas tenían hasta 83 días de edad, lo que indica que esta familia posee una fase larval pelágica prolongada. Esto plantea una contradicción, ya que mientras algunas especies con fases larvales más largas parecen tener la capacidad de cruzar barreras oceánicas, otras

especies a pesar de contar con un desarrollo larval considerable, no logran hacerlo. Por lo tanto, aunque la duración de la etapa larval es un factor importante, no es el único determinante en la capacidad de dispersión de los peces arrecifales. La supervivencia y dispersión de *H. nicholsi* también dependen de la influencia de las corrientes oceánicas que, como se discutió anteriormente, en el caso de Revillagigedo es limitada o, esta situación dificulta que las larvas de esta especie crucen la brecha oceánica de manera independiente.

Existen otros factores que pueden afectar la supervivencia de larvas, juveniles y adultos en diversas regiones geográficas, lo que a su vez impacta en los patrones de estructura genética y conectividad en los organismos marinos (Luiz et al., 2012; Riginos y Victor 2001). En particular, los remolinos a mesoescala, tanto ciclónicos como anticiclónicos, pueden generar dispersión o retención larval en organismos marinos. Por ejemplo, los remolinos ciclónicos se distinguen por tener una picnoclina en forma de domo en su centro, esto ocurre debido al afloramiento de aguas subsuperficiales y a un patrón de flujo divergente en la superficie, este patrón genera la dispersión de organismos planctónicos hacia los bordes del remolino (Bakun, 2006), generando que las larvas sean transportadas a otras áreas del océano. En contraste, los remolinos anticiclónicos presentan forma de valle en el centro, produciendo el hundimiento de la picnoclina, esto crea un flujo que lleva a los organismos hacia el centro del remolino, provocando la retención larval (Muhling et al., 2007; Bakun, 2006; Crawford et al., 2005). Craig et al. (2006) propusieron que los remolinos a mesoescalas anticiclónicos podrían explicar el aislamiento de *Epinephelus clippertonensis* en la isla de Clipperton, los autores mencionan que las corrientes de baja intensidad que rodean la isla durante el periodo de desove del mero en Clipperton indican que las larvas podrían no dispersarse a grandes distancias desde la isla y que los remolinos generados cerca de la isla permiten el retorno de las larvas a su lugar de origen contribuyendo a su aislamiento. Esta idea coincide con el trabajo de Romero-Torres et al. (2018), quienes plantean que los remolinos al suroeste, especialmente en la entrada del Golfo de California, actúan como una barrera que separa las poblaciones peninsulares de las continentales. Esto ayudó a explicar la baja conectividad genética entre las ecorregiones del Pacífico Tropical Mexicano y en la provincia de Cortés en el coral *Pocillopora*. Ambos estudios destacan cómo los remolinos pueden influir en la retención larval y la conectividad genética, al crear barreras físicas que limitan la dispersión de larvas en organismos marinos. Actualmente, se sabe que este fenómeno de remolinos anticiclónicos está presente en el archipiélago de Revillagigedo (Friscione, 2017). Chaigneau et al. (2009) registraron la aparición de estructuras de mesoescala, como remolinos, que se forman a lo largo de la costa continental y al sur de los archipiélagos, incluyendo Revillagigedo. Por lo tanto, la influencia de los remolinos anticiclónicos en Revillagigedo podría retener las larvas. Dado que el ciclo de vida de *Halichoeres nicholsi*, incluye una fase larval prolongada de 38 días, es probable que la retención larval en

Revillagigedo debido a estos remolinos contribuya a la estructuración genética de sus poblaciones. Finalmente, la limitada influencia de corrientes oceánicas puede impedir que las larvas de *H. nicholsi* crucen la brecha oceánica, convirtiéndola en una barrera efectiva. Este aislamiento, es reforzado por la acción de los remolinos anticiclónicos que genera la retención larval, podría explicar la diferenciación genética observada en las poblaciones de *H. nicholsi* en Revillagigedo.

4.2 Comparación de patrones: *Halichoeres adustus* en el continente y *H. nicholsi* en el continente y Galápagos

En el análisis de las poblaciones continentales de *Halichoeres adustus* se observó un aislamiento entre las provincias continentales: Mexicana y Panámica (Figura 3a, 3b y 3c). Este patrón parece estar influenciado principalmente por las características ecológicas de la especie, que se encuentra confinada a hábitats someros, y por características oceanográficas del PTO, así como por la brecha arenosa centroamericana. La biología de *H. adustus* tiene un papel crucial en esta dinámica, ya que su adaptación a hábitats específicos limita su capacidad de dispersión y, por ende, el intercambio genético entre las poblaciones. Desde el punto de vista oceanográfico, esta preferencia de hábitats podrían limitar su dispersión a pesar de la influencia de corrientes costeras latitudinales en el PTO, como la Corriente Costera Mexicana con un ancho de 90–180 km y una profundidad de 250–400 m, generada por vientos locales a través del equilibrio de Sverdrup (Godínez et al., 2010) y la Corriente Costera de Costa Rica con dirección hacia el norte a lo largo de la costa y viceversa, con velocidades de 20–25 cm/s y una profundidad de 100–150 m en invierno y verano, donde durante los meses de junio y agosto, cuando presenta su mayor actividad, puede llegar hasta la boca del Golfo de California (Robertson et al., 2024). Aunque estas corrientes costeras podrían facilitar la dispersión larval (Craig et al., 2006), debido a las características particulares de *H. adustus*, parece reducir su efectividad para dispersarse a través de estas corrientes. Además, los sistemas de surgencias los cuales se intensifican por las depresiones del golfo de Tehuantepec, al sur de México; el golfo de Papagayo, en el norte de Costa Rica y el golfo de Panamá, al este de Panamá y Colombia (Robertson et al., 2024). Durante el invierno los vientos en estas áreas aumentan su fuerza, generando remolinos anticiclónicos. Estos remolinos anticiclónicos como se ha descrito anteriormente, podrían generar una barrera adicional, al retener las larvas y reducir la probabilidad de dispersarse.

Además, es importante considerar que, en el Pacífico Tropical Oriental, existen dos brechas arenosas: la de Sinaloa y la centroamericana, las cuales, según Hastings (2000) desempeñan un papel importante en

los procesos de especiación en esta región. En particular, la brecha centroamericana, *-que se extiende aproximadamente 700 km desde el Istmo de Tehuantepec, México hasta arrecife de los Cóbano en el norte del El Salvador (Hastings (2000) -*, podría influir en limitar la dispersión debido a la preferencia de hábitats de *Halichoeres adustus*. Esta idea concuerda con un estudio realizado con *Thalassoma lucasanum*, donde se observó que este pez presenta una estructuración genética entre las poblaciones ubicadas al sur y al norte de la brecha centroamericana, atribuida en parte a las características biológicas de la especie (Guevara-Reyna, 2017). Por lo tanto, las características ecológicas de esta especie parecen limitar su capacidad para cruzar barreras y el desplazamiento a través de las corrientes.

En contraste, *Halichoeres nicholsi* mostró homogeneidad genética a lo largo de la costa continental, y en el archipiélago de Galápagos (Figura 4a, 4b y 4c). Esta homogeneidad genética podría deberse en parte a la capacidad generalista de esta especie para habitar en distintos tipos de hábitats. Según estudios en los arrecifes coralinos de la Isla Gorgona, Colombia, indicó que este pez es común en sustratos rocosos y de coral, pero su presencia es esporádica en fondos arenosos y pozas de marea (Rubio, 1986), lo que le permite adaptarse a diversas condiciones ecológicas y facilitar su dispersión en diferentes áreas del PTO. Este patrón de homogeneidad genética coincide con un estudio realizado en *Halichoeres poeyi* y *Halichoeres bivittatus* en hábitats tropicales, en donde los autores no obtuvieron una estructura genética, a lo largo de la distribución estudiada, pero sí una estructura genética en *H. radiatus/brasiliensis* ($d = 0.024$). Los autores mencionan que estos resultados están influenciados por las preferencias de hábitat. Tanto *H. poeyi* como *H. bivittatus* fueron encontrados en todos los hábitats muestreados, que incluían desde praderas marinas hasta arrecifes de coral, mientras que el *H. radiatus/brasiliensis* son considerados especialistas de arrecifes, finalmente los autores indican que es posible que los procesos evolutivos en este género estén influenciados por los factores ecológicos (Rocha et al., 2005). Otro de los factores que pueden influir en la homogeneidad genética en esta especie, es el flujo de las corrientes costeras, como la Corriente Costera de Costa Rica y la Corriente de Panamá, que podrían facilitar la dispersión y el intercambio genético entre las islas Galápagos y las provincias continentales del PTO.

Adicionalmente, el patrón de homogeneidad en *H. nicholsi*, sugiere que las brechas de Sinaloa y centroamericana pudiera no afectar su distribución. Esto concuerda con lo reportado para *Epinephelus labriformis*, en donde los autores indican que la población continental de esta especie es panmíctica, ya que no se observó una divergencia genética a lo largo de la costa del PTO (Craig et al., 2006). Aunque existe una hipótesis y respaldada en algunos casos, que sugiere que estas interrupciones biogeográficas fomentan la diferenciación poblacional (Avise, 1992; Bowen y Avise, 1990) se ha demostrado que, en ciertos linajes, algunas de estas interrupciones no tienen ese efecto (Burton, 1998). Por lo tanto, el impacto

de las barreras biogeográficas, parece variar y depender de las interacciones complejas de los organismos en su entorno y entre los organismos (Craig et al., 2006). En conclusión, la homogeneidad genética observada en *H. nicholsi* entre las poblaciones continentales y el archipiélago de Galápagos sugiere que la flexibilidad de esta especie para habitar distintos tipos de sustratos, junto con la influencia de corrientes como la Corriente Costera de Costa Rica y la Corriente de Panamá, facilita su dispersión y el intercambio genético en el continente-Archipiélago de Galápagos. A diferencia de otras especies donde las brechas de Sinaloa y Centroamericana parecen limitar su dispersión, *H. nicholsi* parece atravesar estas barreras sin dificultad.

Capítulo 5. Conclusiones

Halichoeres adustus presentó diferenciación genética en la Isla del Coco en todos los genes utilizados (*cox1*, *Myo* y *Rho*), mientras que *H. nicholsi* presentó diferenciación genética en el archipiélago de Revillagigedo basado en el gen *cox1*.

Los marcadores nucleares al presentar tasas de sustitución más lenta, como *Rho*, evidenció una falta de aislamiento geográfico en *H. nicholsi*, a pesar de que el gen *cox1* mostró una diferenciación clara.

La diferenciación genética (*cox1*, *Rho* y *Myo*) en *H. adustus* entre isla-continente puede atribuirse a varios factores, la brecha oceánica que funge como una barrera natural que limita el movimiento de esta especie, debido a sus características ecológicas como preferencia a hábitat someros, así como a factores oceanográficos como el Domo de Costa Rica, que influye en la retención de larvas marinas. La diferenciación genética (*cox1*) en *H. nicholsi* entre Isla Revillagigedo-continente puede atribuirse a la brecha oceánica que separa a ambos. Esta brecha actúa como barrera efectiva para la dispersión de las larvas, ya que la limitada influencia de corrientes oceánicas restringe el movimiento de organismos hacia y desde el archipiélago. Además, factores oceanográficos, como los remolinos anticiclónicos a mesoescalas influyen en la retención larval, contribuyendo a su diferenciación genética en el haplogrupo de Revillagigedo.

Los resultados para ambas especies, también reflejaron una alta diversidad genética a nivel haplotípico y una baja diversidad nucleotídica, características de especies que han experimentado un evento de cuello de botella, seguido de una expansión poblacional; sin embargo, en el presente estudio no se realizaron análisis demográficos, por lo que la interpretación debe tomarse con cautela.

La diferenciación genética observada en *H. adustus* y *H. nicholsi* proporciona una visión valiosa sobre los factores que afectan la estructura genética de las especies marinas. Estos resultados resaltan la importancia de considerar no solo las características biológicas y ecológicas, sino también los factores oceanográficos para comprender mejor la historia evolutiva de estas especies.

Literatura citada

- Allen, G., & Edgar, G. (2010). *Halichoeres adustus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2010*, e.T183771A8174095. <https://www.iucnredlist.org/species/183771/8174095>
- Allen, G., Robertson, R., Rivera, F., Edgar, G., & Zapata, F. (2010). *Halichoeres nicholsi*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2010*, e.T184035A8225762. <https://www.iucnredlist.org/species/184035/8225762>
- Aceves-Medina, G., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Hinojosa-Medina, A., Funes-Rodríguez, R., Saldierna Martínez, R. J., & Smith, P. E. (2004). Fish larvae assemblages in the Gulf of California. *Journal of Fish Biology*, 65, 832-847. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00490.x>
- Arbogast, B. S., & Kenagy, G. J., (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28, 819–825. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00594.x>
- Anderson, T. J. C., Komuniecki, R., Komuniecki, P. R., & Jaenike, J. (1995). Are mitochondria paternally inherited in *Ascaris*? *Int. J. Parasitol.*, 25, 1001-1004. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00007-o](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00007-o)
- Avise, J.C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63, 62–76. <https://doi.org/10.2307/3545516>
- Avise, J. C. (2000). Phylogeography: The History and Formation of Species. *Heredity* 85, (201), 447. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.0765d.x>
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x>
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*. 18, 489-522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>
- Avise, J. C., Ball, R. M., & Arnold, J. (1988). Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Molecular Biology and Evolution*, 5(4), 331-344. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040504>
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- Barbadilla, A. (2012). La genética de poblaciones. *Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra (Barcelona)*, 27(10). <https://www.cienciarazonfyfe.com/assets/archivos/articulos1478538434.pdf>
- Bakun, A. (2006). Fronts and eddies as key structures in the habitat of marine fish larvae: opportunity, adaptive response and competitive advantage. In: Olivar MP & JJ Govoni (eds). Recent advances

- in the study of fish eggs and larvae. *Scientia Marina* 70(S2), 105-122. <https://doi.org/10.3989/scimar.2006.70s2105>
- Barber, P. H., & Bellwood, D. R. (2005). Biodiversity hotspots: evolutionary origins of biodiversity in wrasses (*Halichoeres: Labridae*) in the Indo-Pacific and new world tropics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 35(1), 235-253. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.004>
- Bernal-Hernández, M. E., Beltrán-López, R. G., Robertson, D. R., Baldwin, C. C., Espinoza, E., Martínez-Gómez, J. E., Barrazas, E., Angulo, A., Valdiviezo-Rivera, J., González Acosta, A. F., & Domínguez-Domínguez, O. (2024). Cryptic diversity in *Scorpaenodes xyris* (Jordan & Gilbert, 1882) (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) throughout the tropical eastern Pacific. (*En prensa*).
- Bobadilla, R. L., & Sunny, A. (2021). Análisis de la categoría de riesgo de los ajolotes de arroyos de alta montaña (Caudata: Ambystoma). *Acta zoológica mexicana*, 37. <https://doi.org/10.21829/azm.2021.3712315>
- Bowmaker, J. K., & Hunt, D. M. (2006). Evolution of vertebrate visual pigments. *Current Biology*, 16(13), R484-R489. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.03.025>
- Bowen, B., & Avise, J.C. (1990). Genetic structure of Atlantic and Gulf of Mexico populations of sea bass, menhaden, and sturgeon: influence of zoogeographic factors and life-history patterns. *Marine Biology*, 107, 371–381. <https://doi.org/10.1007/bf01313418>
- Burton, R.S. (1998). Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution*, 52, 734–745. <https://doi.org/10.2307/2411268>
- Briggs, J.C. (1974). Marine zoogeography. *New York McGraw-Hill*. <https://doi.org/10.2307/1442613>
- Briggs, J. C., & Bowen, B. W. (2012). A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of Biogeography*, 39(1), 12–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02613.x>
- Castellanos-Galindo, G. A., Giraldo, A., & Rubio, E. A. (2005). Community structure of an assemblage of tidepool fishes on a tropical eastern Pacific rocky shore, Colombia. *Journal of Fish Biology*, 67(2), 392-408. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00735.x>
- Castellanos-Galindo, G. A., Krumme, U., & Willis, T. J. (2010). Tidal influences on fish distributions on tropical eastern Pacific rocky shores (Colombia). *Marine Ecology Progress Series*. 416, 241-254. <http://dx.doi.org/10.3354/meps08768>
- Carisio, L., Cervella, P., Palestrini, C., DelPero, M., & Rolando, A. (2004). Biogeographical patterns of genetic differentiation in dung beetles of the genus *Trypocopris* (Coleoptera, Geotrupidae) inferred from mtDNA and AFLP analyses. *Journal of Biogeography*, 31(7), 1149-1162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.01074.x>
- Coates, A. G., & Obando, A. (1996). The geologic evolution of the Central American isthmus. Pages 21-56 in]. B. C.Jackson, A. F. Budd, and A. G. Coates, eds. *Evolution and environments in tropical America*. University of Chicago Press, Chicago, 23, 434. <https://doi.org/10.1017/s0094837300016821>
- Coates, A. G., Obando, J. A., Jackson, J. B. C., & Budd, A. F. (1996). Evolution and environment in tropical America. *Evolution and Environment in Tropical America* (JBC Jackson, AF Budd, and A. G. Coates,

- Editors), University of Chicago Press, Chicago, 77, 21-56. <https://doi.org/10.1017/s0025315400071964>
- Coates, A. G., McNeill, D. F., Aubry, M. P., Berggren, W. A., & Collins, L. S. (2005). An introduction to the geology of the Bocas del Toro Archipelago, Panamá. *Caribbean Journal of Science*, (3), 374-391. https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/3831/Coates_McNeill_Aubry_Berggren_and_Collins_2005.pdf
- Contreras-Catala, F., Sánchez-Velasco, L., Lavín, M. F., & Godínez, V. M. (2012). Three-dimensional distribution of larval fish assemblages in an anticyclonic Eddy in a semi-enclosed sea (Gulf of California). *Journal of Plankton Research*, 34(6), 548-562. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs024>
- Crawford, W. R., Brickley, P.J., Peterson, T.D., & Thomas, A.C. (2005). Impact of Haida Eddies on chlorophyll distribution in the eastern Gulf of Alaska. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52(7-8), 975-989. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.02.011>
- Craig, M. T., Hastings, P. A., Pondella, D. J., Ross Robertson, D., & Rosales-Casián, J. A. (2006). Phylogeography of the flag cabrilla *Epinephelus labriformis* (Serranidae): implications for the biogeography of the Tropical Eastern Pacific and the early stages of speciation in a marine shore fish. *Journal of Biogeography*, 33(6), 969-979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01467.x>
- Cowman, P. F., & Bellwood, D. R. (2013). The historical biogeography of coral reef fishes: global patterns of origination and dispersal. *Journal of biogeography*, 40(2), 209-224. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jbi.12003>
- Domínguez-Domínguez, O. & Vázquez-Domínguez, E., (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 59-70. <https://doi.org/10.32800/abc.2009.32.0059>
- Duda, T. F., & Lessios, H. A. (2009). Connectivity of populations within and between major biogeographic regions of the tropical Pacific in *Conus ebraeus*, a widespread marine gastropod. *Coral Reefs*, 28, 651-659. <https://websites.umich.edu/~tfduda/pdf/duda-lessios-2009.pdf>
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1-8. <https://bmcecolvol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-7-214>
- Edgar, G.J., Banks, S., Farina, J.M., Calvopina, M. & Martinez, C. (2004). Regional biogeography of shallow reef fish and macro-invertebrate communities in the Galapagos archipelago. *Journal of Biogeography* 31, 1107-1124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.01055.x>
- Espinoza, M., & Salas, E. (2005). Estructura de las comunidades de peces de arrecife en las islas Catalinas y Playa Ocotál, Pacífico Norte de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 53(3-4), 523-536. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442005000200020&script=sci_arttext&lng=en
- Escalante, T. (2009). Un ensayo sobre regionalización biogeográfica. *Revista mexicana de biodiversidad*, 80(2), 551-560. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2009.002.627>
- Erismán, B. E., Galland, G. R., Mascarenas, I., Moxley, J., Walker, H. J., Aburto-Oropeza, O., & Ezcurra, E. (2011). List of coastal fishes of Islas Marías archipelago, Mexico, with comments on taxonomic composition, biogeography, and abundance. *Zootaxa*, 2985(1), 26-40.

<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.2985.1.2>

- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Ekman, S. (1953). Zoogeography of the sea. *BioScience*, 3(2), 17-417. <https://doi.org/10.1093/aibsbulletin/3.2.17-e>
- Forbes, E., Goodwin-Austin, R., & Cloyne R. A (1859). The natural history of the European seas. Ed; Facsimile Publisher: London, UK. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.79360>
- Figueroa, R.E.R. (2001). *Caracterización de la ictiofauna de los arrecifes de la parte interna del Golfo Dulce, Costa Rica*. [Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica]. Repositorio Digital <https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UCR.000006049>
- Freeland, J. R. (2005). Molecular ecology. *John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England*, 388. <https://archive.org/details/molecularecology0002free>
- Freeland, J. R., Heather K., & Petersen S. (2011). Molecular ecology. *John Wiley & Sons*. 10.1002/9780470979365
- FishBase. (2024). Search FishBase. World Wide Web electronic publication. Consultado el 15 de marzo del 2024. www.fishbase.org
- Froese, R., & Pauly, D. (Eds.). (1999). FishBase 99: Conceptos, estructura y fuentes de datos (S. Meseguer & M. Fernández, Trans.). *ICLARM*. https://www.fishbase.se/manual/Spanish/fishbasedisclaimer_and_copyright.htm
- Friscione, R. (2017). Área de Refugio para Proteger Especies Acuáticas del Archipiélago de Revillagigedo. *Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)*, 4-194. http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/SicoselIntranet/ProductosEsperados/64152_2018_ETJ_Refugio_Revillagigedo.pdf
- García-Andrade, A. B., Beltrán-López, R. G., Pérez-Rodríguez, R., Domínguez-Domínguez, O., Mejía-Mojica, H., & Doadrio, I. (2021). Evolutionary history of the Aztec shiner *Aztecula sallaei* (Günther, 1868) (Teleostei: Cyprinidae): An endemic and monotypic species of Mexico. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(8), 2103-2118. <https://doi.org/10.1111/jzs.12555>
- Guevara-Reyna, P. E. (2017). *Variabilidad genética y filogeografía del pez arrecifal arcoíris de Cortés, Thalassoma lucasanum, en el Pacífico Oriental Tropical*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Digital <https://biblioteca.cicese.mx/catalogo/tesis/ficha.php?id=24954>
- Glynn, P. W., & Ault, J. S. (2000). A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. *Coral reefs*, 19, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s003380050220>
- Glynn, P. W., Mones, A. B., Podestá, G. P., Colbert, A., & Colgan, M. W. (2017). El Niño-Southern Oscillation: effects on Eastern Pacific coral reefs and associated biota. *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific: Persistence and loss in a dynamic environment*, 251-290. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_8

- Gilbert, C. H. (1890). A preliminary report on the fishes collected by the steamer Albatross on the Pacific coast of North America during the year 1889, with descriptions of twelve new genera and ninety-two new species. *Proceedings of the United States National Museum*. 13 (797), 49-126. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.13-797.49>
- Gomon, M. F. (1995). Labridae. Viejas, doncellas, señoritas. En W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, & V. Niem (Eds.), *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental* (pp. 1201-1225). FAO. <http://www.fao.org/docrep/010/v6250s/v6250s00.htm>
- Godínez, V.M., Beier, E., Lavín, M.F., & Kurczyn, J.A. (2010). Circulation at the nentrance of the Gulf of California from satellite altimeter and hydrographic observations. *J Geophys Res* 115. <https://doi.org/10.1029/2009jc005705>
- Glynn, P. W., & Ault, J. S. (2000). A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. *Coral reefs*, 19, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s003380050220>
- Hastings, P. A. (2000). Biogeography of the tropical eastern Pacific: distribution and phylogeny of chaenopsid fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 128(3), 319-335. <https://doi.org/10.1006/zjls.1998.0196>
- Hare, M. P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(12), 700-706. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02326-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02326-6)
- Hardy, M. E., Grady, J. M., & Routman, E. J., (2002). Intraspecific phylogeography of the slender made tom: the complex evolutionary history of the Central Highlans of United States. *Molecular Ecology*, 11, 2393–2403. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01616.x>
- Hebert, P., Ratnasingham, S., & De Waard. J. (2003). Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proceedings of the Royal Society of London.Series B: Biological Sciences*, 270. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., & Graham, C.H. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(1), 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.016>
- Hodge, J., & Bellwood, D. R. (2015). On the relationship between species age and geographical range in reef fishes: are widespread species older than they seem? *Global Ecology and Biogeography*, 24(4), 495-505. <https://doi.org/10.1111/geb.12264>
- Hofmann, W. A., Richards, T. A., & de Lanerolle, P. (2009). Ancient animal ancestry for nuclear myosin. *Journal of cell science*, 122(5), 636-643. <https://10.1242/jcs.030205>
- Hurtado, L.A., Mateos, M., Santamaria, C.A., (2010). Phylogeography of Supralittoral Rocky Intertidal Ligia Isopods in the Pacific Region from Central California to Central Mexico. *PLoS ONE* 5 (7), e11633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011633>
- Knowles, L. (2009). Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 593-612. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095702>
- Kleyvas, J. A., McManus, J.W. & Meñez, L.A.B. (1999). Environmental limits to coral reef development:

- where do we draw the line? *Am Zool* 39, 146–159. <https://doi.org/10.1093/icb/39.1.146>
- Kessler, W.S. (2006). The circulation of the eastern tropical Pacific: a review. *Prog Oceanogr* 69(2–4), 181–217. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2006.03.009>
- Laínez, G., & Paúl, L. (2019). *Estructura de las comunidades de peces arrecifales asociados a los bajos de la Reserva Marina El Pelado diciembre 2018-mayo 2019*. [Bachelor's thesis, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. Repositorio Digital <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5040>
- Lanteri, A., & Confalonieri, V. (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*, 185-194. https://www.academia.edu/33247560/2003_filogeografia_pdf
- León-Tejera, H., Serviere-Zaragoza, E., & González-González, J. (1996). Affinities of the marine flora of the Revillagigedo Islands, Mexico. *Herbario & Laboratorio de Ficología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*, 159-168. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00047801>
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution*, 6(9), 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lessios, H. A., & Baums, I. B. (2017). Gene flow in coral reef organisms of the Tropical Eastern Pacific. *Coral reefs of the eastern tropical Pacific: persistence and loss in a dynamic environment*, 477-499. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_16
- Lessios, H. A., & Robertson, D. R. (2006). Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1598), 2201-2208. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3543>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lu, G., & Bernatchez, L. (1999). Correlated trophic specialization and genetic divergence in sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*): support for the ecological speciation hypothesis. *Evolution* 53, 1491–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05413.x>
- Ludt, W., Bernal, M., Bowen B., & Rocha, L. (2012). Living in the Past: Phylogeography and Population Histories of Indo-Pacific Wrasses (*Genus Halichoeres*) in Shallow Lagoons versus Outer Reef Slopes. *PLoS ONE* 7(6), e38042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038042>
- Luiz, O. J., Madin, J. S., Robertson, D. R., Rocha, L. A., Wirtz, P., & Floeter, S. R. (2012). Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes. *Proc. Royal Soc. B* 279 (1730), 1033–1040. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1525>
- Lynch, M. (1993). The mutational meltdown in asexual populations. *J. Hered.* 84, 339-344. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111354>
- Meekan, M.G., Ackerman, J.L., & Wellington, G.M. (2001) Demography and age structures of coral reef damselfishes in the tropical eastern Pacific Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 212, 223–232. <https://doi.org/10.3354/MEPS212223>

- Muhling, B. A., Beckeley, L. E & Olivar, M. P. (2007). Ichthyoplakton assemblage structure in two meso-scale Leeuwin Current eddies, eastern Indian Ocean. *Deep-Sea Research Part II* 54, 1113-1128. <https://doi.org/10.1016/J.DSR2.2006.05.045>
- Munday, P. L. (2004). Habitat loss, resource specialization, and extinction on coral reefs. *Global Change Biology*, 10(10), 1642-1647. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00839.x>
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Archivo PDF.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. *Oxford university press*. <https://academic.oup.com/book/53504>
- Pantoja, D. A., Marinone, S. G., Parés-Sierra, A., & Gómez-Valdivia, F. (2012). Modelación numérica de la hidrografía y circulación estacional y de mesoescala en el Pacífico Central Mexicano. *Ciencias Marinas*, 38(2), 363-379. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802012000300003
- Palmerín-Serrano, P. N., Tavera, J., Espinoza, E., Angulo, A., Martínez-Gómez, J.E., González-Acosta, A.F., & Domínguez-Domínguez, O. (2021). Evolutionary history of the reef fish *Anisotremus interruptus* (Perciformes: Haemulidae) throughout the Tropical Eastern Pacific. *J. Zoolog. Syst. Evol.* 59, 148-162. <https://doi.org/10.1111/jzs.12392>
- Palmerín-Serrano, P. N., Piñeros, V. J., Robertson, D. R., Angulo, A., Espinoza, E., Barraza, E., & Domínguez-Domínguez, O. (2023). Comparative phylogeography and demographic histories of five widely distributed tropical eastern Pacific fishes. *Marine Biology*, 170(12), 158. <https://doi.org/10.1007/s00227-023-04299-w>
- Riginos, C., & Victor, B. C. (2001). Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in eastern Pacific blennioid fishes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 268 (1479), 1-6. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1748>
- Rocha, L. A. (2004). Mitochondrial DNA and Color Pattern Variation in Three Western Atlantic *Halichoeres* (Labridae), with the Revalidation of Two Species. *Copeia*, 2004(4), 770–782. <http://dx.doi.org/10.1643/CG-04-106>
- Rocha, L. A., Robertson, D. R., Roman, J., & Bowen, B. W. (2005). Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 272(1563), 573-579. <https://doi.org/10.1098/2004.3005>
- Robertson, D. R., Grove, J. S., & McCosker, J. E. (2004). Tropical transpacific shore fishes. *Pacific Science*, 58(4), 507-565. <https://doi.org/10.1353/psc.2004.0041>
- Robertson, D. R., & Cramer, K. L. (2009). Shore fishes and biogeographic subdivisions of the Tropical Eastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 380, 1-17. <https://doi.org/10.3354/meps07925>
- Robertson, D. R., Allen, G. R., Peña, E., & Estape, A. (2024). Peces costeros del Pacífico Oriental Tropical: Sistema de información en línea (Versión 3.0). *Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales*. <https://biogeodb.stri.si.edu/sftep/en/pages>
- Rosenblatt, R. H. (1974). Faunal areas. *Science* 186, 1028-1029. Archivo PDF.
- Romero-Torres, M., Treml, E. A., Acosta, A., & Paz-García, D. A. (2018). The Eastern Tropical Pacific coral

- population connectivity and the role of the Eastern Pacific Barrier. *Scientific Reports*, 8(1), 9354. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27644-2>
- Rubio, E. A. (1986). Notas sobre la ictiofauna de la Isla de Gorgona, Colombia. *Boletín Ecotropical* 13, 86-112. Archivo PDF.
- Saarman, N. P., Louie, K. D., & Hamilton, H. (2010). Genetic differentiation across eastern Pacific oceanographic barriers in the threatened seahorse *Hippocampus ingens*. *Conserv. Genet.* 11, 1989–2000. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10592-010-0092-x.pdf>
- Sandoval-Huerta, E. R., Beltrán-López, R.G., Pedraza-Marrón, C.R., Paz-Velásquez, M.A., Angulo, A., Robertson, D.R., Espinoza, E., & Domínguez-Domínguez, O., (2019). The evolutionary history of the goby *Elacatinus puncticulatus* in the tropical eastern pacific: Effects of habitat discontinuities and local environmental variability. *Mol. Phylogenet. Evol.* 130, 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.10.020>
- Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Archivo PDF.
- Scataglini, M. A., Lanteri, A. A., & Confalonieri, V. A. (2006). Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetic*, 126, 353-368. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-1399-2>
- Stephens, M., & Donnelly, P. (2003). A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* 73 (5), 1162–1169. <https://doi.org/10.1086/379378>
- Smith, P. J., & Fujio, Y. (1982). Genetic variation in marine teleosts: high variability in habitat specialist and low variability in habitat generalists. *Mar. Biol.* 69, 7–20. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00396955>
- Spalding, M.D., Fox, H. E., Allen, G.R., & Davidson, N. (2007). Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. *Bioscience* 57, 573–583. <https://doi.org/10.1641/B570707>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-272. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Tholan, B., Carlson, P., Tortolero-Langarica, J. J., Ketchum, J. T., Trejo-Ramírez, A., Aceves-Bueno, E., & Caselle, J. E. (2020). The biodiversity of fishes at the Islas Mariás Biosphere Reserve, Mexico, as determined by baited remote underwater video. *Ciencias marinas*, 46(4), 227-252. <https://doi.org/10.7773/cm.v46i4.3104>
- Torres-García, R. Q., Gaither, M. R., Robertson, D. R., Torres-Hernández, E., Caselle, J. E., Durand, J. D., & Domínguez-Domínguez, O. (2024). Geographic genetic variation in the Coral Hawkfish, *Cirrhichthys oxycephalus* (Cirrhichthidae), in relation to biogeographic barriers across the Tropical Indo-Pacific. *PeerJ*, 12, e18058. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.18058>
- Torres-Hernández, E., Betancourt-Resendes, I., Solís-Guzmán, M. G., Robertson, D. R., Angulo, A.,

- Martínez-Gómez, J. E., & Domínguez-Domínguez, O. (2022). Phylogeography and evolutionary history of the Panamic Clingfish *Gobiesox adustus* in the Tropical Eastern Pacific. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 173, 107496. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107496>
- Torres-Hernández, E., Betancourt-Resendes, I., Díaz-Jaimes, P., Angulo, A., Espinoza, E., & Domínguez-Domínguez, O. (2020). Independent evolutionary lineage of the clingfish *Gobiesox adustus* (Gobiesocidae) from Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68, 306-319. <https://doi.org/10.15517/rbt.v68is1.41201>
- Thomson, D.A., Findley L. T., & Kerstitch A. (1979). Reef fishes of the sea of Cortez. *New York: John Wiley and Son*. <https://doi.org/10.1017/s0025315400040492>
- Vázquez-Domínguez, E. (2002). Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. In: Protected areas and the regional planning imperative in North America: 369–378 (G. Nelson, J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky & C. Vásquez, Eds.). *Univ. of Calgary Press, Canada*. <http://dx.doi.org/10.1515/9781552384350-027>
- Vázquez-Domínguez, E. (2007). Filogeografía y vertebrados. In: La ecología molecular de plantas y animales: (L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, Eds.). 441–466. https://scholar.google.com.mx/citations?view_op=list_works&hl=es&hl=es&user=OgEZg-8AAAAJ&pagesize=80
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T., & Gutiérrez-García, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277-297. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2009000200009>
- Victor, B.C. (1986). Duration of the planktonic larval stage of one hundred species of Pacific and Atlantic wrasses (family Labridae). *Marine Biology* 90(3), 317-326. <https://doi.org/10.1007/BF00428555>
- Victor, B.C. (1987). Growth, dispersal, and identification of planktonic labrid and pomacentrid reef-fish larvae in the eastern Pacific Ocean. *Mar Biol* 95, 145–152. <https://doi.org/10.1007/bf00447496>
- Victor, B.C., & Wellington, G. M. (2000). Endemism and the pelagic larval duration of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 205, 241-248. <https://doi.org/10.3354/meps205241>
- Walker, B.W. (1960). The distribution and affinities of the marine fish fauna of the Gulf of California. *Systematic zoology*. 9, 123-133. <https://doi.org/10.2307/2411961>
- Walker, B.W. (1966). The origins and affinities of the Galapagos shorefishes. In: Bowman RI (ed) The Galapagos. *University of California Press, Berkeley*, 172-174. Archivo PDF.
- Wainwright, P. C., Santini, F., Bellwood, D. R., Robertson, D. R., Rocha, L. A., & Alfaro, M. E. (2018). Phylogenetics and geography of speciation in New World *Halichoeres* wrasses. *Molecular phylogenetics and evolution*, 121, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.12.028>
- Waples, R. S., Mariani, S., & Benvenuto C. (2018). Consequences of sex change for effective population size. *Proc. R. Soc. B* 285, 20181702. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.1702>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.

<https://doi.org/10.1093/genetics/16.2.97>

Wellington, G.M., & Victor, B.C. (1989) Planktonic larval duration of one hundred species of Pacific and Atlantic damselfishes (Pomacentridae). *Mar Biol* 101, 557–567. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00541659>

Wellington, G.M., & Victor B. C. (1985). El Niño mass coral mortality: a test of resource limitation in a coral reef damselfish population. *Oecologia* 68, 15–19. <https://doi.org/10.1007/bf00379466>

Zink, R. M., (2002). Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 953–959. <https://doi.org/10.1093/icb/42.5.953>