

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ecología Marina**

**Análisis comparativo de los patrones de conectividad
genética de especies arrecifales del Pacífico mexicano**

Tesis

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

Presenta:

María Geovana León Pech

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

María Geovana León Pech

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Co-Director del Comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera
Co-Director del Comité

Dr. José Antonio Cruz Barraza

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Dr. Alejandro Francisco Parés Sierra



Dr. David Alberto Rivas Camargo
Coordinador Programa de Posgrado en Ecología Marina

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

María Geovana León Pech © 2015

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis que presenta **María Geovana León Pech** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ecología Marina.

Análisis comparativo de los patrones de conectividad genética de especies arrecifales del Pacífico mexicano

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Co-Director del Comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera
Co-Director del Comité

En los ecosistemas marinos, la mayoría de las especies poseen una fase larval pelágica o planctónica que les permite dispersarse entre diferentes hábitats fragmentados como son los sistemas arrecifales. Este mecanismo conocido como conectividad poblacional, representa un proceso clave para los invertebrados y especies demersales porque les permite el intercambio genético y la renovación de sus poblaciones, lo cual juega un rol importante en el mantenimiento de la biodiversidad. El nivel de conectividad en las especies con etapa larvaria depende de múltiples factores biológicos que incluyen: el periodo larvario, modos nutricionales, tipos de desarrollo, habilidades de nado, así como las características oceanográficas que pueden favorecer o limitar el transporte larvario a grandes distancias, entre otros factores.

En este trabajo se planteó que el nivel de conectividad genética de dos especies arrecifales del Pacífico mexicano, está determinado por el potencial de dispersión larvario y las características oceanográficas de la región. El objetivo de estudio fue evaluar la estructura genética y estimar el nivel de flujo genético de las poblaciones de *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus*.

Los resultados mostraron que *C. vermifera* posee niveles de diversidad genética consistentemente bajos tanto en las secuencias de ADN mitocondrial como del ADN nuclear. No obstante, se encontró diferenciación genética significativa a lo largo de la región de estudio. Los patrones de diferenciación genética mostraron dependencia geográfica en los genes mitocondriales con bajas tasas evolutivas, ya que se encontró mayor similitud genética entre localidades a escala de decenas de km que a escalas mayores. Mientras que en el locus nuclear todas las muestras se diferenciaron significativamente, lo cual es compatible con la limitada capacidad de dispersión de la especie. El modelo de aislamiento por distancia significativo está asociado a la historia de vida característica de las esponjas perforadoras que consiste en corto periodo larval y comportamiento filopátrico. Además, los patrones de diferenciación genética de *C. vermifera* concuerdan con otras especies coralinas simpátricas, y sugieren la influencia de mecanismos genéticos y ecológicos a nivel de comunidad sobre la composición genética de las especies coralinas del Pacífico mexicano. Se encontraron diferencias genéticas fijadas que sugieren que las localidades sureñas de la localidad de Oaxaca podrían estar experimentando especiación incipiente. Con respecto a las poblaciones de *S. flavilatus*, tanto en el ADN mitocondrial como en los loci microsatelitales no se detectaron significativos de diferenciación en todas las escalas espaciales estudiadas, y los valores de flujo genético fueron muy altos. La alta conectividad concuerda con el

periodo larvario de la especie de hasta 23 días. El flujo genético alto y asimétrico encontrado en las poblaciones de *S. flavilatus* podría estar reflejando un patrón general más reciente de estructura asociado con las características oceanográficas del Pacífico mexicano. Los resultados generados no rechazaron la hipótesis de este trabajo, al encontrar alta congruencia en el grado de conectividad con la historia de vida de cada especie.

Finalmente, el análisis comparativo de los patrones de conectividad entre ambas especies, sugiere que la señal genética está mediada por sus atributos de historia de vida. El tipo de larva de *C. vermifera* es lecitotrófica con limitada dispersión y presentó una señal genética de tiempo histórico. Por otro lado, *S. flavilatus* posee un tipo de larva planctotrófica con alta dispersión y la señal genética detectada en esta especie podría estar reflejando eventos recientes de dispersión.

En este estudio se reconoce la importancia de implementar un enfoque multidisciplinario que supere las limitaciones de incluir una sola herramienta para detectar patrones de conectividad en poblaciones que presentan una dinámica muy compleja.

Palabras clave: Conectividad genética, dispersión, diversidad genética, flujo genético, esponjas perforadoras, peces arrecifales

Abstract of the thesis presented by **María Geovana León Pech** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Ecología Marina.

Comparative analysis of the genetic connectivity patterns of coral reefs species from Mexican Pacific

Abstract approved by:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Co-Director del Comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera
Co-Director del Comité

Most marine species presents a pelagic or planktonic larval stage, allowing them to disperse across different fragmented habitats, such as coral reefs. This mechanism known as population connectivity, represents a key process for invertebrates and demersal species for genetic exchange and population replacement, which plays an important role for biodiversity. The level of connectivity is influenced by diverse biological factors such as the larval period, nutritional guilds, type of development and swimming capability. Moreover, physical conditions may promote or limit the larval transport over long distances.

We suggested that the level of genetic connectivity in two reef species from the Mexican Pacific is mediated by the potential of larval dispersal and oceanographic characteristics of the region. The aim of this study was to evaluate the genetic structure and to estimate the level of gene flow of *Cliona vermifera* and *Stegastes flavilatus* populations.

Cliona vermifera showed genetic diversity levels consistently low in DNA sequences from two mitochondrial genes and one nuclear gene; however, they revealed strong and significant genetic differentiation throughout the study region. Patterns of genetic differentiation from the slow-evolving mitochondrial genes were geographic scale dependent but not the nuclear genes. We found higher mitochondrial genetic similarity among localities at 10–100s km than at larger scales (100–1000s km). However, all samples were genetically differentiated at the nuclear locus, which is inconsistent with frequent long distance dispersal. Significant isolation by distance is consistent with life history traits shared by boring sponges: a short larval period and larval philopatric behavior. The patterns of genetic differentiation in *C. vermifera* concur with those found in other sympatric coral species, and suggest the influence of community-wide ecological and genetic mechanisms on the genetic makeup of coral reef species in the Mexican Pacific. Fixed genetic differences suggest that the southern population of Oaxaca may be experiencing incipient speciation. On the other hand, *S. flavilatus* populations revealed no significant levels of differentiation in both the mitochondrial DNA and microsatellite loci at all spatial scales, and gene flow estimates were very high. High connectivity matches the *S. flavilatus* larval period, up to 23 days. High asymmetrical gene flow found in populations of *S. flavilatus* may reflect a recent general pattern of structure associated with the oceanographic characteristics of the Mexican Pacific.

Results confirm the hypothesis of this paper, finding consistency in the high connectivity associated with the life history of each species.

Finally, the comparative analysis of patterns of genetic connectivity of both species suggests that the genetic signal is mediated by life history attributes. *C. vermifera* has lecithotrophic larvae with restricted dispersal potential and presented mostly a historical genetic signal. On the other hand, *S. flavilatus* has planktotrophic larvae with high dispersal potential and its genetic signal may reflect recent dispersal events.

In this study, the importance of implementing a multidisciplinary approach that overcomes the limitations of including a single tool to detect patterns of connectivity in populations with a very complex dynamics was recognized.

Keywords: Genetic connectivity, dispersal, genetic diversity, gene flow, boring sponge, coral reef fish

Dedicatorias

En el norte o en el sur, de oriente a occidente allí te encuentro, eres mi esencia,
mi alfa y omega, **mi DIOS**

A MI MADRE Amparo, tu fe, tu generosidad, tu entrega, tu inteligencia, tu
fortaleza han marcado mi vida y me han conducido siempre a vivir con plenitud,
siempre agradecida

A MI PADRE Gaspar, me enseñaste que después de esas aguas azules había un
mundo que descubrir y por el cual maravillarse. Tu pasión por los mares ha sido
mi inspiración

A MIS HERMANOS Gaspar, Liliana y Nazaret, su apoyo incondicional, su
confianza y su amor son el motor de mi vida

A MIS ANGELITOS Andrea, Didier, Ailín, Addamari, Gaspar, Miguel, Mariely,
Karen y Lumina. Sus sonrisas, su abrazo, su cariño, su inocencia, su sola presencia
le da luz a mi vida. Deseo ser siempre su apoyo y compartir con ustedes lo
hermoso de la vida

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante mi estancia en el doctorado.

A la coordinación de Ecología Marina y a la Dirección de Estudios de Posgrado de CICESE, por el apoyo económico otorgado para finalizar la tesis.

A mi comité de tesis: Dr. José Antonio Cruz Barraza, Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte y Dr. Alejandro Francisco Parés Sierra, por sus valiosas aportaciones durante el proceso del doctorado, por el ambiente de respeto y cordialidad que siempre generaron en los avances de tesis y por el interés que siempre mostraron en éste proyecto.

Al Dr. Miguel Lavín, por la valiosa información que me proporcionó. q.e.p.

De manera particular agradezco a mis directores de tesis:

Al Dr. Axayácatl Rocha Olivares, por cumplir cabalmente con su compromiso de dirigirme en éste proyecto.

Al Dr. Luis Calderón por su apoyo económico durante mi preparación para aplicar al doctorado y en las salidas de campo. Sin duda toda la ayuda que me proporcionó fue clave para poder realizar éste proyecto.

A ambos, porque trabajaron asiduamente para cumplir ésta meta tan anhelada.

Quiero expresar un profundo agradecimiento a dos investigadores que estuvieron involucrados en éste proyecto. Sus aportaciones fueron sustanciales:

Al Dr. Jose Luis Carballo Cenizo, por su participación en la coautoría del artículo científico derivado de esta tesis.

Al Dr. Miguel Ángel por enseñarme rigurosamente sobre el manejo de datos de secuenciación de nueva generación y la anotación del genoma mitocondrial de *Stegastes Flavilatus*, del cual se generó una nota científica.

De manera especial agradezco a Anita y a Celia por motivarme a aprender el manejo de datos de nueva generación. Su iniciativa y apoyo incondicional le dió un plus a mi formación doctoral que está dando buenos frutos.

A Gema Franklin por su colaboración en la traducción del primer borrador del artículo científico.

Al Dr. David Alberto Rivas Camargo, coordinador del Posgrado en Ecología marina, por apoyarme eficientemente en los trámites administrativos.

A todo el equipo de coralinólogos del Pacífico mexicano. En especial al Dr. Andrés López, al Dr. Fabián Rodríguez y a todos los estudiantes que pusieron su granito de arena y me ayudaron en la recolección de los organismos. Me disculpo por no incluir sus nombres, pero cada uno recibe un reconocimiento de mi parte y un sincero agradecimiento. Sin su ayuda, este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Francisco García de León y al Dr. Eduardo Francisco Balart Páez , por aceptarme en sus instalaciones en el CIBNOR para el procesamiento de las muestras.

Al Dr. David Paz, por incluirme en sus salidas de campo para la recolección de las muestras.

Al M. en C. José Melendez y al M. en C. Fernando Cremas, por apoyarme en la identificación y recolección de muestras.

Al Dr. Omar Chassin por proporcionarme tejido de *Stegastes flavilatus*.

A Ivonne y Argelia, por su colaboración en el trabajo de procesamiento de muestras.

A José M. Domínguez, Francisco Ponce e Isabel Hernández por el apoyo gráfico en las imágenes.

A todos los profesores que me transmitieron sus conocimientos y me ayudaron a ampliar mi visión de lo que forma parte del quehacer científico.

Al personal de CICESE, que han hecho muy agradable mi estancia en CICESE. En especial a Elizabeth Farías, Lucía Roman, Lupita Rodriguez, Julieta Castro, Dolores Sarracino, Citlali Romero y Karla Aceves.

A mis compañeros de doctorado, por sus valiosos comentarios y sugerencias en las reuniones de discusión. Maricarmen, Ricardo, Kena, Nancy, Erick, Andrea, Jose, Eleana, Manuel, Jenny, Alex, Tere, Isabel y Anita. Espero que estas reuniones sean cada vez más concurridas y frecuentes ya que enriquecen sustancialmente la formación de un doctorand@.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Molecular (EcoMol), de cada uno me llevo una virtud, me siento afortunada por haber coindidido: me quedo con la tenacidad de Nancy, la camaradería de Erick, la chispa de Anita, la dulzura de Marianita, el compañerismo de Pablo, la perseverancia de Francesco, la espontaneidad de Celia, la serenidad de José, la seriedad de Argelia y la audacia de Ivonne. Su compañerismo y complicidad han compensado las noches y fines de semana de trabajo en el laboratorio, podría decir que incluso las disfrutaba junto a ustedes.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología pesquera y de la zona costera (EPZC), Jenny, Orión, Ginna, Magda, Bárbara. Gracias por su calidez y su amistad. Las circunstancias ocasionaron muchas ausencias en el grupo pero siempre disfruté de su agradable compañía.

Al grupo de Ciceseanas, Nancy, Anita, Isabel, Jenny, Cecilia y Tere. Juntas hemos compartido los momentos de estrés, pero todo parece tener sentido con una salida a un café o con una copa de vino y con su invaluable compañía.

A mi queridos amigos Evita y Arturo, a Carlos, a mis sisters: Karencita, Edith, Gisela, Maricela y Grace. Muchas gracias por ser un soporte para mi cuando lo he necesitado. También han sido una pieza fundamental para culminar con esta meta.

A mis eternas compañeras y amigas, a la distancia me han apoyado y animado durante este tiempo: Ruby, Elvia y Patito.

También quiero agradecer a las personas que durante mi estancia en ensenada han formado parte de mi vida de tal forma que puedo considerarme afortunada por tener tanta gente hermosa a mi lado. De manera especial a:

Mariana (Hylla), Elizabeth, Anita y Nancy, gracias por su cariño y generosidad, en ustedes he podido encontrar el amor fraterno y verdadero aún lejos de casa. En mi corazón llevo todos los momentos de convivencia y de aprendizaje. Sin duda he aprendido mucho de cada una de ustedes, mis grandes amigas, mis hermanas.

A cada personas que no menciono en este apartado pero que he recibido de ellas una motivación y ánimo para llegar a este momento. Muchas gracias!!!

A las personas que llegarán, con las que me tocará iniciar nuevos proyectos, que me permitirán compartir todo lo que hasta ahora he recibido.

A MI FAMILIA, por animarme a vivir ésta experiencia y a llegar hasta donde mis límites no alcanzan, por enseñarme a tener Fé. En ellos recibo cada día lo más hermoso y esencial de la vida: el amor, la calidez y la dulzura de un hogar.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iv
Dedicatorias	vi
Agradecimientos	vii
Lista de figuras	xii
Lista de tablas	xv
Capítulo 1. Introducción general	1
1.1. Concepto de conectividad.....	1
1.2. Conectividad en ecosistemas marinos: la dispersión larval	1
1.3. Factores que influyen en la conectividad poblacional en los ecosistemas marinos.....	33
1.4. Herramientas para medir la conectividad poblacional	5
1.5. Justificación	8
1.6. Preguntas de investigación.....	9
1.7. Objetivos.....	10
Capítulo 2. Análisis de la estructura genética poblacional de la esponja excavadora <i>Cliona vermifera</i> (Hancock, 1867), a diferentes escalas geográficas en el Pacífico mexicano	11
2.1. Introducción.....	11
2.2. Metodología.....	14
2.2.1. Localidades de estudio y recolección de muestras	14
2.2.2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	14
2.2.3. Análisis genéticos.....	16
2.3. Resultados	18
2.3.1. Variación de las secuencias de ADN y diversidad genética	18
2.3.2. Estructura genética	20
2.4. Discusión.....	23
2.4.1. Patrones de variabilidad genética	24
2.4.2. Patrones de estructura genética.....	26
2.4.3. Dispersión y redes de conectividad de hábitat	27
2.4.4. Limitaciones de los marcadores moleculares.....	28

Capítulo 3. Patrones de conectividad genética de la Damisela: <i>Stegastes flavilatus</i> (Gill, 1862) en comunidades coralinas del Pacífico mexicano	31
3.1. Introducción. Dispersión y conectividad en peces arrecifales	31
3.2. Metodología.....	36
3.2.1. Localidades de estudio y recolección de muestras	36
3.2.2. Extracción de ADN, amplificación, secuenciación de ADNmt y genotipificación de loci microsatelitales.....	36
3.2.3. Análisis genéticos de la región control del ADNmt	40
3.2.4. Análisis genéticos de loci microsatelitales.....	41
3.3. Resultados	43
3.3.1. Región control del ADNmt.....	43
3.3.1.1. Diversidad genética.....	43
3.3.1.2. Estructura genética.....	44
3.3.2. Loci microsatelitales	45
3.3.2.1. Diversidad genética.....	45
3.3.2.2. Estructura genética.....	49
3.3.2.3. Patrón de flujo genético.....	50
3.4. Discusión.....	53
3.4.1. Patrón de diversidad genética de <i>Stegastes flavilatus</i> en el PM	53
3.4.2. Estructura genética	55
3.4.3. Patrón de migración asimétrico	56
3.5. Perspectivas.....	57
Capítulo 4. Análisis comparativo de los patrones de conectividad en especies marinas arrecifales con historia de vida contrastante	60
4.1. Retos en el estudio de la conectividad: escalas espaciales y temporales.....	60
4.1.1. Análisis de la conectividad en especies con diferente historia de vida.....	60
4.1.2. Enfoque genético para medir conectividad.....	61
4.1.3. Escalas de medición de los métodos genéticos	64
4.2. Análisis comparativo de las especies analizadas en este trabajo	65
4.3. Conectividad y estructura genética en especies arrecifales del Pacífico mexicano	67
4.4. Enfoque multidisciplinario para detectar patrones de conectividad	73
Referencias bibliográficas	75

Lista de figuras

- Figura 1.** Ruta de la conectividad en el océano, inicia con la liberación de propágulos (larvas, esporas, gametos) de los organismos marinos. En la figura se enlistan algunos factores físicos y biológicos que influyen en cada etapa de la ruta de conectividad. La conectividad realizada se lleva a cabo a través de diferentes vías (1) reclutamiento de propágulos, (2) supervivencia de los juveniles (los propágulos se han transformado exitosamente de larvas o post-larvas a juveniles), y (3) reproducción (cuando el organismo reclutado en la población se ha reproducido exitosamente). Modificado de Crooks y Sanjayan (2006). 4
- Figura 2.** Esquema conceptual del transporte larval, dispersión larval y conectividad poblacional reproductiva. Los colores hacen distinción de cada concepto. AZUL: transporte larval, VERDE: dispersión, NARANJA: conectividad. Ejemplo: El recuadro de conectividad significa que ésta es función de la dispersión (representada con la flecha verde) y la sobrevivencia post-larval. Modificado de Pineda (2007). 5
- Figura 3.** Figura 1. *Cliona vermifera* Hancock, 1867, Se observan las papilas (puntos color salmón) abiertas en la parte inferior del coral *Pavona gigantea*, tomado de Carballo et al. (2008 b). 13
- Figura 4.** Locallidades de muestreo y gráficas de pastel que representan la distribución geográfica y frecuencias haplotípicas para cada gen mitocondrial (COI y ATP6) y nuclear (ITS). 20
- Figura 5.** Representación de los patrones geográficos de diferenciación genética mediante el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (MDS), con los dos marcadores mitocondriales (COI y ATP6) y nuclear (ITS). 22
- Figura 6.** Prueba de aislamiento por distancia de *Cliona vermifera* en el Pacífico mexicano. Gráfica de dispersión de puntos de las distancias genéticas (F_{st}) de los marcadores mitocondriales (COI y ATP6) y nuclear (ITS) en función de la distancia geográfica (km). 23
- Figura 7.** Diagrama de bigotes representando el valor medio, con el error estándar de los datos incluidos dentro de la caja. El diagrama incluye datos de las distancias genéticas inter e intraespecíficas del gen mitocondrial COI de las especies de *Cliona*: *C. vermifera*, *C. chilensis*, *C. celata*, *C. delitrix*, *C. viridis*, y *C. jullieni*. La distancia máxima intraespecífica de los haplotipos de *C. vermifera* fue de 0.006. El análisis incluyó 13 secuencias en las distancias interespecíficas y 11 en las intraespecíficas. 26

- Figura 8. *Stegastes flavilatus*. A) Fase juvenil, b) Fase adulta, © Copyright Gerald Allen, 2006.** 34
- Figura 9. Modelo conceptual de estructura metapoblacional dada por la dispersión y colonización de poblaciones fuente (representadas en círculos más oscuros). Los círculos grises representan las poblaciones sumidero y los círculos blancos representan poblaciones aisladas por barreras físicas o biológicas. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).** 35
- Figura 10. A) Gráficas de pastel representando la distribución geográfica y frecuencias haplotípicas de la región control de *Stegastes flavilatus* del Pacífico mexicano. B) Red de parsimonia estadística de haplotipos de la región control de *S. flavilatus* del PM. La red muestra las relaciones entre los 26 haplotipos encontrados en *S. flavilatus*. Cada haplotipo está representado con un círculo; el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos con ese haplotipo, que está especificado entre parentesis para los que se encontraron más de una vez; los haplotipos fueron numerados en orden de abundancia decreciente. Los círculos blancos son haplotipos únicos y privados (se presentaron en una población). Las líneas que conectan los círculos representan un paso mutacional. El círculo negro pequeño representa un haplotipo intermedio inferido que no fue encontrado en la muestra. Los haplotipos en A están coloreados de acuerdo a B incluyendo a los haplotipos privados representados en color blanco.**44
- Figura 11. A) Probabilidad de grupos en equilibrio genotípico y de ligamiento obtenido mediante STRUCTURE utilizando el método propuesto por Evanno *et al.* (2005). B) Probabilidad de pertenencia de cada individuo a un posible grupo genético identificado (asignado a un color).....** 50
- Figura 12. Modelos de flujo genético más usados. a) Estructura de isla donde el flujo genético es igual entre islas del mismo tamaño; b) Estructura de "stepping-stone" lineal donde las poblaciones más cercanas presentan mayor nivel de flujo genético. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).** 62
- Figura 13. Resolución de la información a escala temporal. Características de historia de vida de las especies, métodos genéticos y variabilidad de los marcadores moleculares.** 64
- Figura 14. Corrientes superficiales de la costa occidental de México. Las flechas representan los patrones generales de circulación superficial. CC: Corriente de California; COM: Corriente Occidental de México; GT: Giro de Tehuantepec y CCCR: Corriente costera de Costa Rica. La flecha sólida en la entrada del golfo de California indica la circulación**

oceánica en verano; la flecha punteada representa el cambio de circulación oceánica en invierno. Los puntos representan las localidades de estudio de *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus*, ya descritas en los capítulos anteriores. Modificado de Paz-García et al. (2012)..... 72

Lista de tablas

- Tabla 1. Tipos de desarrollo larval de peces e invertebrados marinos y sus relaciones hipotéticas con diferentes niveles de conectividad: (A) alta conectividad; (M) moderada o variable y (B) baja conectividad. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006). 3
- Tabla 2. Enfoques metodológicos para el estudio del transporte larval y conectividad poblacional. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006). 6
- Tabla 3. Secuencias de los cebadores de ADNmt y nuclear y la temperatura de anillamiento usada para la amplificación por PCR. COI, Citocromo Oxidasa sub unidad 1; ATP6, ATP sintasa, sub unidad 6; ITS, Espaciador Transcrito Interno, incluyendo parte de 18S RNAr, ITS1, el 5.8S gen RNAr, ITS2, y parte del 28S RNAr..... 16
- Tabla 4. Niveles de diversidad mitocondrial (ATP6 y COI) y nuclear (ITS) de *Cliona vermifera* del Pacífico mexicano. n, número de individuos analizados; A, número de haplotipos; h, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; LP, La Paz; II, Isla Isabel; PM, Punta Mita; IM, Islas Marietas; OAX, Oaxaca; N.A.: no hay datos..... 19
- Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con los marcadores mitocondriales (COI y ATP6) y nuclear (ITS) de *Cliona vermifera* del Pacífico mexicano. 21
- Tabla 6. Los valores pareados de los índices de fijación molecular (ϕ_{st}) entre muestras de *Cliona vermifera* en el Pacífico mexicano en dos genes mitocondriales (COI y ATP6) y uno nuclear (ITS). Negritas: Significancia después de corrección de Bonferroni ($\alpha = 0.05$); N.A.: no hay datos. LP, La Paz; II, Isla Isabel; PM, Punta Mita; IM, Islas Marietas; OAX, Oaxaca. 21
- Tabla 7. Secuencias de los cebadores usados para la amplificación de los 6 loci microsatelitales heterólogos; F: fluoróforo utilizado; M R: motivo de repetición; Talla: rango de tamaños alélicos..... 38
- Tabla 8. Condiciones de termociclado para cada locus, con sus respectivas temperaturas de anillamiento, modificado de Schuelke (2000)..... 39
- Tabla 9. Condiciones de termociclado con el método de reamplificación, para cada locus con sus respectivas temperaturas de anillamiento. 40
- Tabla 10. Niveles de diversidad en la región control de *Stegastes flavilatus* del Pacífico mexicano. n, número de individuos analizados; A, número de haplotipos; h, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; LP, La

Paz; II, Isla Isabel; NEG, Negritos; MAN, Manzanillera; ZAC, Zacatoso y OAX, Oaxaca.....	43
Tabla 11. Localidades, PP: parámetros poblacionales analizados para cada locus, localidad y promedios; N = tamaño de muestra, A = número de alelos, rA = riqueza alélica.....	46
Tabla 12. Diversidad de loci microsatelitales, analizados por localidad, coeficiente de endogamia (Fis), heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho). Valores de p en negritas representan datos significativos en la prueba del equilibrio de H-W después de la corrección de Bonferroni.....	48
Tabla 13. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con los 6 loci microsatelitales de <i>Stegastes flavilatus</i> del Pacífico mexicano.....	49
Tabla 14. Estimaciones de tamaños poblacionales efectivos ($\theta = 2 Ne \mu$) y tasas de migración entre poblaciones ($M = m/\mu$) de <i>Stegastes flavilatus</i> . Los números entre paréntesis y en negritas representan las categorías que se asignaron a los valores de M de acuerdo a las diferencias en el orden de magnitud: (1) Mínimo; (2) Intermedio y (3) Máximo.....	52
Tabla 15. Loci microsatelitales específicos de <i>Stegastes flavilatus</i> , diseñados por medio de la secuenciación de nueva generación.....	59
Tabla 16. Tabla comparativa de los resultados generales de <i>Cliona vermifera</i> y <i>Stegastes flavilatus</i>	66

Capítulo 1.

Introducción general

1.1. Concepto de conectividad

En su nivel más fundamental, la conectividad se refiere al grado en que los organismos, procesos o elementos se mueven en la naturaleza, “a mayor movimiento, mayor conectividad”. A diferentes niveles y escalas todos están en un constante movimiento y por ende a diferentes niveles de conectividad. Por lo tanto, la definición, funcionalidad y medida de la conectividad depende del taxa o proceso de interés y la escala espacial y temporal en la cual ellos ocurren (Crooks y Sanjayan, 2006).

En consecuencia, al día de hoy no existe una definición única de la conectividad y que lo abarque todo. Diversos autores abordan el concepto de conectividad desde una variedad de perspectivas: metapoblaciones, ecología del paisaje, flujo de energía, organismos, material genético, dentro y entre poblaciones. Por lo tanto, la conectividad es un concepto altamente dinámico (Crooks y Sanjayan, 2006).

1.2. Conectividad en ecosistemas marinos: la dispersión larval

La conectividad es un concepto empleado para describir el movimiento o intercambio de organismos entre hábitats en diferentes escalas espaciales y temporales y tiene consecuencias a nivel poblacional y de comunidad. Estos movimientos pueden ocurrir en los estados de vida embrionarios y larvarios, juveniles o adultos (Crooks y Sanjayan, 2006). En los ecosistemas marinos la mayoría de los organismos poseen una fase larval pelágica o planctónica que les permite el intercambio de individuos entre sitios (Cowen y Sponaugle, 2009; Gaines *et al.*, 2007).

Este mecanismo conocido como **conectividad poblacional** se considera un proceso clave para la renovación de las poblaciones y el intercambio genético (Cowen *et al.*,

2007; Pineda *et al.*, 2007). Es por ello que la conectividad juega un rol importante en la adaptación local y especiación así como en la extinción local (Salas *et al.*, 2010).

La conectividad marina de una especie está influenciada por múltiples factores biológicos y factores físicos que incluyen: tiempo y localización del desove, periodo larval pelágico (PLD por sus siglas en inglés), su interacción con la dirección y velocidad de las corrientes oceánicas y la distribución del hábitat disponible para el asentamiento (Cowen y Sponaugle, 2009).

En el caso de los invertebrados marinos y peces, sus larvas exhiben una diversidad de modos nutricionales, tipos de desarrollo, duración planctónica, habilidades de nado, comportamiento y patrones de desarrollo morfológico que pueden afectar los patrones de conectividad (Tabla 1). Por ejemplo, las especies con desarrollo indirecto tienen mayor probabilidad de ser dispersadas favoreciendo así el flujo genético entre las poblaciones de adultos sésiles o sedentarios (Crooks y Sanjayan, 2006).

Por otro lado, muchos hábitats marinos se encuentran fragmentados o en parches de manera natural, por lo que se ha adoptado una interpretación de la conectividad basada en metapoblaciones, donde los paisajes son vistos como una red de parches de hábitats o fragmentos en donde las especies se presentan como poblaciones locales discretas conectadas por la migración activa y pasiva de individuos (Crooks y Sanjayan, 2006). Si la proporción de reclutas que inmigran de otras poblaciones es alto, la población estará bien conectada al resto de la metapoblación. Los procesos tales como la circulación oceánica, duración del desarrollo planctónico, comportamiento larval y el éxito en el asentamiento determinarán los patrones espaciales y temporales de la conectividad poblacional.

Tabla 1. Tipos de desarrollo larval de peces e invertebrados marinos y sus relaciones hipotéticas con diferentes niveles de conectividad: (A) alta conectividad; (M) moderada o variable y (B) baja conectividad. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).

Tipo de nutrición:		
	Lecitotrófico	A
	Planctotrófico	B
Tiempo de periodo planctónico:		
	Teleplánica	A
	Actaeplánica	M
	Braquiplánica	B
	Aplánica	B
Sitio de desarrollo:		
	Pelágica	A
	Planctónica	A
	Nerítica	M
	Béntica/demersal	B
	Aplanctónica	B
Tipo de desarrollo:		
	Indirecto	A
	Directo	B

1.3. Factores que influyen en la conectividad poblacional en los ecosistemas marinos

El nivel de conectividad entre las poblaciones marinas está determinado profundamente por las propiedades intrínsecas de las especies, como las características de historia de vida larval y también por factores extrínsecos tales como la disponibilidad de alimento entre otros (Figura 1) (Reitzel *et al.*, 2004).

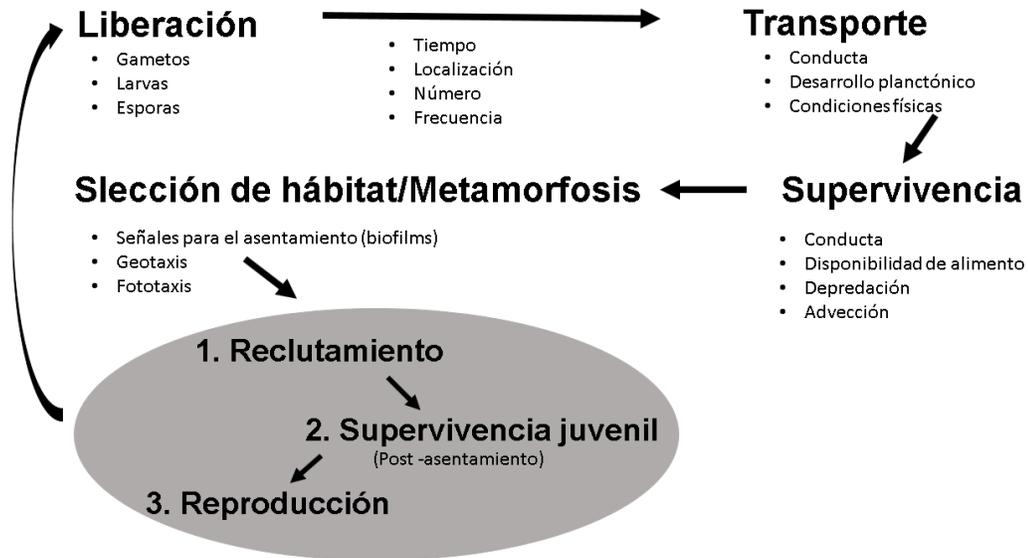


Figura 2. Ruta de la conectividad en el océano, inicia con la liberación de propágulos (larvas, esporas, gametos) de los organismos marinos. En la figura se enlistan algunos factores físicos y biológicos que influyen en cada etapa de la ruta de conectividad. La conectividad realizada se lleva a cabo a través de diferentes vías (1) reclutamiento de propágulos, (2) supervivencia de los juveniles (los propágulos se han transformado exitosamente de larvas o post-larvas a juveniles), y (3) reproducción (cuando el organismo reclutado en la población se ha reproducido exitosamente). Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).

Dos conceptos importantes para entender la conectividad poblacional son **el transporte y la dispersión larval** (Cowen *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2007). El primero se refiere al traslado de una larva entre dos puntos y es función del comportamiento natatorio (vertical/horizontal) y los procesos físicos de advección-difusión (Figura 2; Pineda *et al.*, 2007). El segundo se refiere a la propagación de larvas desde su lugar de desove (zona fuente) a un sitio de asentamiento al finalizar el periodo larval (Cowen *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2007). Este mecanismo depende del transporte y la supervivencia de la larva hasta el momento del asentamiento (Pineda *et al.*, 2007). Para que se lleve a cabo la conectividad poblacional es necesario la supervivencia y reproducción de los nuevos colonizadores lo cual dependerá de las condiciones del asentamiento y la tasa de éxito reproductivo (Figura 1 y 2) (Cowen y Sponaugle, 2009; Pineda *et al.*, 2007).

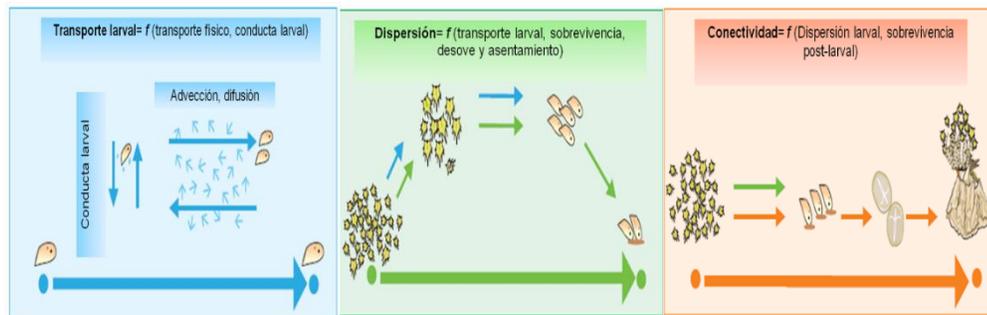


Figura 3. Esquema conceptual del transporte larval, dispersión larval y conectividad poblacional reproductiva. Los colores hacen distinción de cada concepto. AZUL: transporte larval, VERDE: dispersión, NARANJA: conectividad. Ejemplo: El recuadro de conectividad significa que ésta es función de la dispersión (representada con la flecha verde) y la sobrevivencia post-larval. Modificado de Pineda (2007).

1.4. Herramientas para medir la conectividad poblacional

La dispersión juega un papel fundamental en la estructuración de las poblaciones y/o en la conectividad poblacional a diferentes escalas temporales tanto ecológicas como evolutivas. Sin embargo, existe un amplio rango de estrategias de dispersión en especies marinas por lo que, medir o cuantificar directamente los movimientos de diminutos propágulos (larvas) es casi imposible (Levin, 2006). Es por ello que los patrones de dispersión en muchas especies aún permanecen desconocidos (Cowen *et al.*, 2006; Fogarty y Botsford, 2007).

Inicialmente se argumentaba que por su tamaño tan pequeño y su poca capacidad de nado, las larvas eran partículas pasivas transportadas por medio de la advección y por corrientes oceanográficas y que su potencial de dispersión se encontraba determinado principalmente por la duración de su fase pelágica (Grantham *et al.*, 2003). Con base en ello, diversos estudios han encontrado una fuerte correlación entre la duración larval pelágica (PLD por sus siglas en inglés) y la dispersión real lo cual confirma el supuesto de que a mayor PLD habrá una mayor capacidad de dispersión (Bohonak, 1999; Doherty *et al.*, 1995; Weersing y Toonen, 2009). Sin embargo, otros autores han encontrado que la conducta larval o autoreclutamiento y los procesos oceanográficos de mesoescala pueden influir en la retención larval o autoreclutamiento (Warner y Cowen, 2002; Weersing y Toonen, 2009). En contraparte, estudios de genética

poblacional han encontrado alta subdivisión poblacional en especies con alto PLD (Baums *et al.*, 2006; Bowen *et al.*, 2006; Taylor y Hellberg, 2003).

En los esfuerzos por cuantificar la conectividad se han utilizado diversos métodos naturales por ejemplo, marcas químicas (Jones *et al.*, 1999), o ambientales (Swearer *et al.*, 1999; Thorrold *et al.*, 2001), así como artificiales, para estimar el origen de diversos organismos (Tabla 2) (Levin, 2006; Thorrold *et al.*, 2002). El marcaje artificial de larvas marinas, ha aportado una mayor certidumbre en el estudio de la dispersión larval (Thorrold *et al.*, 2002).

Tabla 2. Enfoques metodológicos para el estudio del transporte larval y conectividad poblacional. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).

1.	<p>Seguimiento visual</p> <p>a) Seguimiento a corto plazo por medio de la coloración de la larva por buceo autónomo</p> <p>b) Fotografía aérea de gametos flotantes liberados en masa</p>
2.	<p>Detección de zonas fuente de liberación larval</p> <p>a) Islas, parches arrecifales, montañas submarinas, entre otros.</p> <p>b) Poblaciones marcadas genéticamente o colonias dentro de una metapoblación</p>
3.	<p>Modelación</p> <p>a) Aproximaciones eulerianas, para conocer la fuente de liberación larval o de huevos y las características oceanográficas</p> <p>b) Seguimiento Lagrangiano</p> <p>c) Distancia entre poblaciones para estimar las limitaciones fisiológicas o energéticas para la dispersión</p> <p>d) Modelos de acoplamiento físico biológico, para estimar el transporte y dispersión larval</p>
4.	<p>Estudios geográficos de variación genética</p> <p>a) Alozymas</p> <p>b) DNAm</p> <p>c) Microsatélites</p> <p>d) Secuencias nucleares</p>
5.	<p>Marcaje o etiquetado de larvas</p> <p>a) Marcas artificiales (por ejemplo, métodos de marcado-liberación-recaptura)</p> <p>b) Marcas naturales (específico para el sitio de origen larval)</p>

Existen dos categorías de marcas artificiales, el primero involucra la inmersión de larvas en marcadores químicos (ej. compuestos fluorescentes, isótopos radiactivos) que son incorporados dentro del tejido del cuerpo (Gillanders, 2002). El segundo enfoque se basa en el marcaje físico en estructuras que son formadas por perturbaciones ambientales en estructuras específicas del organismo (señales térmicas) (Thorrold *et al.*, 2002). Estas marcas pueden ser huellas ambientales (señales isotópicas) registradas de por vida en estructuras calcáreas como los otolitos (Herzka, 2005).

También se han utilizado pruebas basadas en espectrometría de masas para examinar la química de estructuras calcificadas en invertebrados marinos y peces que pueden ser usados como marcas naturales o artificiales de origen natal, estas marcas geoquímicas han revelado datos interesantes sobre dispersión larval que están desafiando paradigmas acerca de la escala espacial de la conectividad demográfica en los ecosistemas oceánicos (Thorrold *et al.*, 2007).

Las marcas naturales aplicadas en sistemas marinos han atraído un interés considerable debido a las dificultades asociadas con los estudios tradicionales de marcaje-recaptura. Las marcas naturales son particularmente útiles cuando la probabilidad de recuperación de una marca artificial es limitada debido a una dispersión larval significativa y alta mortalidad. Entre las marcas naturales se encuentran los marcadores ambientales y los genéticos (Thorrold *et al.*, 2002).

El uso de marcadores genéticos para el estudio de la conectividad genética, entendida como el intercambio de genes que influye en la estructura genética de las poblaciones, permite hacer estimaciones del grado en que el flujo genético afecta los procesos evolutivos dentro de las subpoblaciones. Lo anterior, dependerá principalmente del número absoluto de dispersores de la población (Lowe y Allendorf, 2010). El flujo genético puede actuar como una fuerza que mantiene integrada a la especie e influir en procesos ecológicos (Eguiarte *et al.*, 2007). De tal forma que si las poblaciones separadas geográficamente (m a km) intercambian individuos (genes) regularmente, este flujo resultará en una composición genética similar entre ellas y evolucionarán de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva genética). Por el contrario, si las poblaciones no presentan intercambio de individuos por un periodo prolongado de tiempo, empezarán a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento

reproductivo que ocasionará que se generen poblaciones genéticamente diferentes, lo cual favorecerá el surgimiento de nuevas especies (Slatkin, 1994).

En este estudio se evaluó la conectividad genética mediante el uso de marcadores moleculares, usando como indicadores la estructura genética, la dirección y magnitud del flujo genético entre las poblaciones de dos especies abundantes en las comunidades coralinas del Pacífico mexicano.

1.5. Justificación

La atención en el tema de la dispersión y la conectividad ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, impulsado por dos aspectos importantes. En primer lugar, al reconocer que la fragmentación de hábitats puede ser una amenaza para la biodiversidad. En segundo lugar, por el cambio en las demandas que actualmente incluyen el manejo y conservación ecosistémicos a través de la designación de reservas marinas y predicciones de los efectos del cambio climático (Crooks y Sanjayan, 2006; Levin, 2006). En ese sentido, el conocimiento de los patrones de dispersión y conectividad poblacional es central para la sustentabilidad de las reservas marinas, ya que permiten determinar si los reclutas pertenecientes a una área marina protegida son locales o se originan de sitios lejanos, de esta forma ayudan a estimar la escala espacial efectiva del área protegida (Purcell *et al.*, 2006).

Con base en que los hábitats fragmentados mantienen su diversidad a través de la conectividad entre ellos (Crooks y Sanjayan, 2006), es importante conocer el grado en el que las poblaciones son autoreclutadas o reciben subsidio demográfico de otros sitios. Ésto tiene consecuencias en un gran número de procesos ecológicos fundamentales que afectan la regulación y persistencia de las especies, por lo cual el alcance del estudio de la conectividad entre poblaciones es de gran relevancia, ya que permite una mejor comprensión de la dinámica poblacional. En consecuencia, se podrán tomar decisiones más acertadas en el marco de la conservación y manejo sustentable de los recursos marinos (Gillanders, 2002).

En las últimas décadas se han desarrollado instrumentos moleculares y estadísticos que han permitido integrar datos genéticos y geográficos (Galindo *et al.*, 2010; Manel *et al.*, 2003; Munguia-Vega *et al.*, 2014) que han sido muy útiles en el estudio de la conectividad. No obstante, aún existe una deficiencia en el conocimiento detallado de los patrones de conectividad para construir modelos generalizados que incorporen los patrones de distribución e intercambio en los diferentes estadios ontogénicos de especies de diferentes grupos ecológicos.

A diferencia de las costas del Caribe (Baums *et al.*, 2006; Cowen *et al.*, 2006; Galindo *et al.*, 2006; Paris *et al.*, 2005; Salas *et al.*, 2010) en la vertiente del Pacífico se ha generado menor información sobre la dispersión larval y conectividad de poblaciones marinas, por lo que este tipo de estudios es pertinente y necesario.

Este trabajo se enmarca dentro de los proyectos Fondo Sectorial CONACYT – SEMARNAT –INE Ref. 023390, CONACYT -SEP 2008 (102239) y IACOD IB200711-1. Los muestreos se llevaron a cabo con los permisos de colecta concedidos por SAGARPA, (DGOPA.06648.140807.3121 y PPF/DGOPA-070/13).

1.6. Preguntas de investigación

¿Cómo están estructuradas y conectadas genéticamente las poblaciones de dos especies con capacidades de dispersión contrastantes (***Cliona vermifera*** y ***Stegastes flavilatus***), distribuidas en las comunidades coralinas del Pacífico mexicano?

¿El patrón de conectividad genética de las poblaciones de ***Cliona vermifera*** y ***Stegastes flavilatus*** está determinado por el potencial de dispersión larvario y características oceanográficas?

1.7. Objetivos

General

Determinar la estructura genética y los patrones de conectividad de las poblaciones de la esponja perforadora *Cliona vermifera* y del pez *Stegastes flavilatus*.

Específicos

- Estimar el grado de diferenciación genética de las poblaciones de *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus* en ecosistemas arrecifales del Pacífico mexicano.
- Definir los patrones de conectividad genética de poblaciones de *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus* en ecosistemas arrecifales del Pacífico mexicano.
- Comparar los patrones de conectividad genética *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus* que presentan diferente historia de vida y capacidad de dispersión con los patrones de corrientes oceánicas.

Capítulo 2.

Análisis de la estructura genética poblacional de la esponja excavadora *Cliona vermifera* (Hancock, 1867), a diferentes escalas geográficas en el Pacífico mexicano

2.1. Introducción

Las esponjas excavadoras de coral representan un componente esencial de los ecosistemas de arrecifes de coral (Carballo *et al.*, 2008a, b). Estudios recientes sugieren un futuro incremento en la bioerosión como consecuencia de la degradación de los arrecifes coralinos en todo el mundo (Carballo *et al.*, 2013; Nava y Carballo, 2008; Schönberg y Ortiz, 2008; Wisshak *et al.*, 2012b). A pesar de su importancia ecológica, la dinámica poblacional de las esponjas excavadoras, incluyendo el cómo están estructuradas genéticamente y conectadas las poblaciones espacial y temporalmente aún permanece desconocido. Ésta información es de gran relevancia tomando en cuenta su naturaleza sésil y su distribución espacial (en parches) de su hábitat que consiste principalmente de estructuras calcáreas. Los estudios de genética poblacional disponibles de esponjas se enfocan principalmente en especies no excavadoras (Bentlage y Wörheide, 2007; DeBiasse *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2004a, b, c; López-Legentil y Pawlik, 2009; Wörheide *et al.*, 2008), y los estudios de esponjas excavadoras son sobre todo filogenéticos (Barucca *et al.*, 2007; Escobar *et al.*, 2012; Xavier *et al.*, 2010b).

El ADN mitocondrial (ADNmt), ampliamente utilizado en metazoos para estudiar patrones filogeográficos y de estructura genética poblacional, presenta un polimorfismo limitado en las esponjas y cnidarios, debido a que es muy conservado en organismos diploblásticos (Duran *et al.*, 2004b). Sin embargo, la variación del gen mitocondrial COI ampliamente utilizado y muy conservado, en ocasiones ha demostrado ser informativo para abordar las relaciones evolutivas en esponjas (e.gr., Cruz-Barraza *et al.*, 2012); aun así, se han hecho varios esfuerzos para desarrollar nuevos marcadores moleculares (Rua *et al.*, 2011). El espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) también ha sido exitosamente usado en estudios de filogeografía en esponjas

(Bentlage y Wörheide, 2007; Wörheide *et al.*, 2008). Sin embargo, la variación intragenómica y los bajos niveles de polimorfismo podrían limitar su utilidad en algunas especies (Escobar *et al.*, 2012; Lôbo-Hajdu *et al.*, 2004; Wörheide *et al.*, 2004).

La mayoría de estudios sobre genética intraespecífica de esponjas concurren en la búsqueda de niveles significativos de estructura genética a escalas que van de unos pocos metros (Duran y Rützler, 2006; Whalan *et al.*, 2005) a más de 100 km (Benzie *et al.*, 1994; Blanquer y Uriz, 2010; DeBiasse *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2004a, b, c; Duran y Rützler, 2006; López-Legentil y Pawlik, 2009; Noyer y Becerro, 2012; Sole-Cava y Boury-Esnault, 1999; Wörheide *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2010a). Lo que se ha encontrado es una notable e intensa diferenciación genética interpoblacional en los Porifera que ha sido atribuida a las características de su historia de vida (larva lecitotrófica de corta vida y dispersión larval restringida) (Maldonado, 2006) así como a su comportamiento larval filopátrico, que es una característica compartida entre muchas especies de esponjas (Mariani *et al.*, 2000; Uriz *et al.*, 2008; Uriz y Turon, 2012; Uriz *et al.*, 1998), lo cual puede promover un patrón de dispersión que se ajusta al modelo de “stepping-stone” y un consecuente aislamiento por distancia (Wörheide *et al.*, 2008).

En consecuencia, el aislamiento por distancia es un mecanismo potencial de diferenciación. Así mismo, tanto el bajo potencial de dispersión como los factores físicos, tales como las condiciones hidrológicas, podrían jugar un rol significativo en la conformación de la estructura genética de las esponjas (Duran *et al.*, 2004c).

En el Pacífico mexicano (PM), los estudios sobre esponjas excavadoras se han enfocado a su descripción taxonómica y clasificación, biología reproductiva y rol ecológico en las comunidades arrecifales (Bautista-Guerrero, 2006; Bautista-Guerrero *et al.*, 2010, 2014; Carballo *et al.*, 2004; Carballo y Cruz-Barraza, 2005; Carballo *et al.*, 2013b; Carballo *et al.*, 2007; Cruz-Barraza *et al.*, 2011; Nava y Carballo, 2008). En la actualidad, la estructura genética poblacional de las esponjas excavadoras en esta región es desconocida.

Cliona vermifera Hancock, 1867 (Figura 3) es la esponja excavadora más abundante en las comunidades coralinas del PM y su abundancia ha ido incrementando en arrecifes afectados por el blanqueamiento (Carballo *et al.*, 2013b). Se ha encontrado una alta

incidencia de la esponja en corales de diversas morfologías como el coral masivo *Pavona gigantea* (Carballo *et al.*, 2004) y el ramoso *Pocillopora spp.* (Bautista-Guerrero *et al.*, 2014) los cuáles son los principales constructores arrecifales de la región (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998). *C. vermifera* es una especie ovípara gonocórica que se reproduce sexual y asexualmente. La reproducción sexual implica la fertilización interna y liberación de cigotos durante los eventos de desove en todo el año con los picos más altos de julio a noviembre, coincidiendo con las altas temperaturas superficiales (Bautista-Guerrero *et al.*, 2014). Debido a las limitaciones para realizar estudios que permitan estimar la dispersión larval, se desconoce cuál es la duración de la fase larvaria en *C. vermifera*. Sin embargo, se ha encontrado que especies del mismo género poseen larvas asociadas bentónicas con limitada capacidad de dispersión y comportamiento filopátrico (Mariani *et al.*, 2001). Esas características en su historia de vida podrían favorecer la diferenciación genética e independencia demográfica entre las poblaciones.



Figura 4. *Cliona vermifera* Hancock, 1867, Se observan las papilas (puntos color salmón) abiertas en la parte inferior del coral *Pavona gigantea*, tomado de Carballo *et al.* (2008 b).

Para este estudio, se utilizaron secuencias de dos genes del ADN mitocondrial (ADNmt) y uno nuclear para evaluar el nivel de diversidad genética y diferenciación entre las poblaciones de *C. vermifera* en el PM a diferentes escalas espaciales. Además, probar

la hipótesis de que las muestras de esponjas colectadas en el PM revelarán una estructura genética y que los patrones de dispersión serán consistentes con el modelo “stepping-stone”, con base en lo que se conoce sobre los atributos de su historia de vida.

2.2. Metodología

2.2.1. Localidades de estudio y recolección de muestras

Las muestras se recolectaron por medio de buceo autónomo en cinco comunidades coralinas del PM: Bahía de la Paz, Baja California Sur (LP) (24° 02' 41" N, 109° 49' 34" O); Isla Isabel, Nayarit (II) (21° 52' 45" N, 105° 36' 41" O); Punta Mita, Nayarit (PM) (20° 46' 9" N, 105° 32' 15" O); Islas Marietas, Nayarit (IM) (20° 41' 1" N, 105° 36' 41" O) y Bahías de Huatulco, Oaxaca (OAX) (15° 39' 28" N, 96° 29' 17" O) (Figure 4). En cada sitio, se recolectaron al azar ~25 fragmentos de coral infestados por *C. vermifera*. Los fragmentos de coral del género *Pocillopora* se tomaron de colonias vivas, parcialmente vivas, unidas o separadas de la matriz arrecifal, y de coral muerto tendido en el suelo marino. La distancia entre las muestras recolectadas fue de 5 m aproximadamente para evitar el muestreo de clones. Cuando fue posible, las ramas de coral se rompieron en pequeñas piezas que fueron revisadas visualmente en el sitio para confirmar la presencia de *C. vermifera*. Después, el tejido de esponjas fue separado manualmente del coral y se preservaron con etanol al 96% en tubos Eppendorf y se identificaron microscópicamente de acuerdo a Carballo *et al.*, (2004).

2.2.2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Se realizó la extracción de ADN total de *C. vermifera* utilizando un protocolo estándar. Se extrajo el ADN mediante digestión con proteínasa K y una posterior purificación con un protocolo de precipitación salina, seguido por una extracción orgánica y subsecuente precipitación con etanol (Aljanabi y Martinez, 1997).

Se amplificaron dos genes del ADNmt y un gen nuclear por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y posteriormente se enviaron a secuenciar. Los marcadores mitocondriales fueron de secuencias parciales del Citocromo oxidasa I (COI) (Folmer *et al.*, 1994) y el ATP sintasa 6 (ATP6) (Rua *et al.*, 2011). El marcador nuclear fue de la región completa del espaciador interno transcrito (ITS por sus siglas en inglés), desde el extremo del gen 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 hasta el inicio del gen del 28S (Tabla 3). Debido a la dificultad para amplificar la región del ITS en las muestras de OAX se realizaron varias pruebas adicionales para optimizar la PCR con otros primers de ITS (en los resultados se detallará este aspecto) (Tabla 3). Las amplificaciones se llevaron a cabo en 25 µl de volumen de reacción que contenía 180 µM dNTPs, buffer de PCR Perkin Elmer 1X (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl y 2 mM MgCl₂), 0.4 µM de cada primer, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (New England BIOLABS) y 2 µl de ADN genómico (90 ng/µl). Para la amplificación del ITS se utilizó el buffer de PCR (Kapa Buffer A, 1.5 mM Mg); 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) y 2 µl de ADN genómico (20 ng/µl). Para las amplificaciones se utilizó el termociclador PTC-200 DNA-Engine thermal cycler (BIORAD, Hercules, CA). Los perfiles de temperatura para la amplificación de las regiones de COI y ATP6 fueron: 94 °C por 2 min; seguido de 35 ciclos a 94 °C por 50 s; temperatura de anillamiento (Tabla 3) por 50 s; 72 °C por 1 min; seguido por 72 °C por 10 min de extensión final. Para el ITS: 94 °C por 4 min; seguido de 45 ciclos a 92 °C por 30 s; temperatura de anillamiento (Tabla 3) por 45 s; 72 °C por 1 min; seguido por 72 °C por 6 min de extensión final. Para identificar el tamaño y rendimiento de la amplificación se realizó una electroforesis de los productos de PCR en agarosa al 1.5% y se purificaron con ExoSAP-IT (ExoSAP-IT, USB Corporation, Cleveland, OH), para enviarlos a secuenciar en ambos sentidos con los primers de PCR y usando el kit BigDye Terminator v.3.1 en un ABI 3100 Gene Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores de ADNmt y nuclear y la temperatura de anillamiento usada para la amplificación por PCR. COI, Citocromo Oxidasa sub unidad 1; ATP6, ATP sintasa, sub unidad 6; ITS, Espaciador Transcrito Interno, incluyendo parte de 18S RNAr, ITS1, el 5.8S gen RNAr, ITS2, y parte del 28S RNAr.

GEN	MARCADOR (5'-3')	T ^o A (°C)	REFERENCIA
COI	LCOI490	GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG	50 ^a Folmer <i>et al.</i> (1994)
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
ATP6	ATP6porF	GTAGTCCAGGATAATTTAGG	46 Rua <i>et al.</i> (2011)
	ATP6porR	GTTAATAGACAAAATACATAAGCCTG	
ITS	18S	TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCG	49 Lôbo-Hajdu <i>et al.</i> (2004)
	28S	GTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTT	
ITS ^b	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	48-55 White <i>et al.</i> (1990)
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

a: Algunas muestras fueron amplificadas usando 40 °C como temperatura de anillamiento

b: Se probaron primer universales para amplificar las muestras de la localidad de Oaxaca en la combinaciones siguientes: ITS1-ITS4, ITS1-ITS2, ITS3-ITS4.

2.2.3. Análisis genéticos

Las secuencias fueron analizadas y editadas con el programa CODONCODE ALIGNER v.4.0.4 (CodonCode Corp., Dedham, MA) y se alinearon usando el MEGA v.5 (Tamura *et al.*, 2011); los haplotipos se identificaron con DnaSP v.4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Para confirmar la identidad taxonómica y detectar una posible contaminación o amplificación de genes que no fueran de Porifera, se utilizó la función de BLAST para comparar nuestras secuencias con otras ya sometidas en el banco de datos del GenBank disponible en línea, con el fin de encontrar homología con secuencias de la misma especie o sus congéneres.

Los siguientes análisis se realizaron con el programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Los patrones geográficos de diversidad genética se evaluaron con las diversidades haplotípica (h) y nucleotídica (π) (Nei, 1987). Para examinar la estructura poblacional jerárquica, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), tomando en cuenta la matriz de distancias inter-haplotípicas basada en el modelo de evolución nucleotídica óptimo (HKY para los loci mitocondriales) obtenido con el programa JMODELTEST v.2.1.5 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon y Gascuel, 2003), y una matriz de diferencias pareadas no corregidas para las secuencias del ITS debido a la presencia de indels informativos en el alineamiento y la baja divergencia entre haplotipos. El índice de fijación molecular Φ_{st} se calculó para probar la hipótesis de panmixia entre todas las localidades y por pares. La significancia se calculó con pruebas de permutación y para las pruebas múltiples se ajustó la significancia usando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

La matriz de los F_{st} pareados entre localidades se usó para representar gráficamente los patrones de diferenciación genética empleando un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (MDS por sus siglas en inglés), con el programa PRIMER v.6.1.6 (Clarke y Gorley, 2006). Se asignaron tres regiones a priori: la región norteña que incluyó la localidad de LP; la región central integrada por las localidades de II, PM e IM; y la región sureña integrada por la localidad de OAX.

Finalmente se realizó la prueba de aislamiento por distancia; correlacionando las matrices de distancias genéticas (F_{st}) y geográficas (km) entre localidades mediante la prueba de Mantel como está implementada en el programa IBD (Bohonak, 2002), para estimar la relación que existe entre pares de poblaciones con la distancia geográfica.

Según Eguiarte *et al.* (2007),

Este método evalúa la relación del flujo genético entre pares de poblaciones (M , equivalente a Nm entre pares de poblaciones) con la distancia geográfica. Bajo este modelo, los valores de M se estiman a partir de los valores de F_{st} entre pares de poblaciones (medida de diferenciación entre poblaciones) y se aplica una regresión de M en K (K = distancia geográfica). Para determinar si existe una

relación lineal significativa entre flujo génico y la distancia geográfica entre poblaciones.

2.3. Resultados

Todos los genes amplificaron exitosamente en todas las localidades con excepción del ITS en muestras de OAX. En la búsqueda de homologías por el BLAST se encontraron las mayores similitudes con secuencias sometidas en el GenBank de especies congeneres.

2.3.1. Variación de las secuencias de ADN y diversidad genética

Los genes analizados presentaron niveles contrastantes de variación genética. En el alineamiento de las secuencias de COI (650 pares de bases [pb], $n = 73$, número de acceso del Genebank = KP702139-41) se detectaron únicamente cuatro sitios polimórficos que generaron tres haplotipos diferentes, mientras que en el alineamiento de las secuencias de ATP6 (381 pb, $n = 99$, número de acceso del Genebank = KP7021420-47) se detectaron catorce sitios polimórficos que generaron seis haplotipos (2 compartidos y 4 privados), y en el ITS (587 pb, $n = 58$, número de acceso del Genebank = KP411749-59) se detectaron nueve sitios variables y once haplotipos (2 compartidos y 9 privados) (Figura 4; Tabla 4). La variación incrementó de los genes mitocondriales al gen nuclear (COI < ATP6 < ITS) lo cual fue evidente en los índices de diversidad h y π (Tabla 4). Geográficamente, la variación del ADNmt fue incongruente entre genes. Dos localidades (PM e IM) estuvieron fijadas para un haplotipo del gen ATP6, pero con el gen COI se detectaron 2 haplotipos, mientras que la localidad de LP estuvo fijada para un haplotipo del gen COI, y fue la de mayor diversidad en el ATP6 (y en los mitocondriales en general) ($h = 0.79 = 0.0057$). Las secuencias del ADN nuclear fueron las más diversas en general (Tabla 4). Promediando los tres genes, LP e IM fueron las localidades más diversas mientras que OAX siempre estuvo fijada en el ADNmt, y en el locus nuclear no se pudo amplificar. Esta heterogeneidad geográfica

encontrada en la diversidad del ADNmt tuvo consecuencias en los patrones de diferenciación genética.

Tabla 4. Niveles de diversidad mitocondrial (ATP6 y COI) y nuclear (ITS) de *Cliona vermifera* del Pacífico mexicano. n, número de individuos analizados; A, número de haplotipos; h, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; LP, La Paz; II, Isla Isabel; PM, Punta Mita; IM, Islas Marietas; OAX, Oaxaca; N.A.: no hay datos.

GEN		LOCALIDADES					TOTAL
		LP	II	PM	IM	OAX	
COI	n	12	14	18	19	10	73
	A	1	3	2	2	1	3
	h	0.00	0.27	0.11	0.19	0.00	0.62
	π	0.0000	0.0009	0.0002	0.0003	0.0000	0.0019
ATP6	n	20	20	20	20	19	99
	A	5	2	1	1	1	6
	h	0.79	0.10	0.00	0.00	0.00	0.52
	π	0.0057	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0022
ITS	n	11	16	13	18	N.A.	58
	A	2	3	2	7		11
	h	0.18	0.42	0.51	0.79		0.74
	π	0.0006	0.0009	0.0044	0.0052		0.0033
PROMEDIO	A	2.67	2.67	1.67	3.33	1.00	6.67
	h	0.32	0.26	0.21	0.33	0.00	0.62
	π	0.0021	0.0007	0.0015	0.0018	0.0000	0.0024

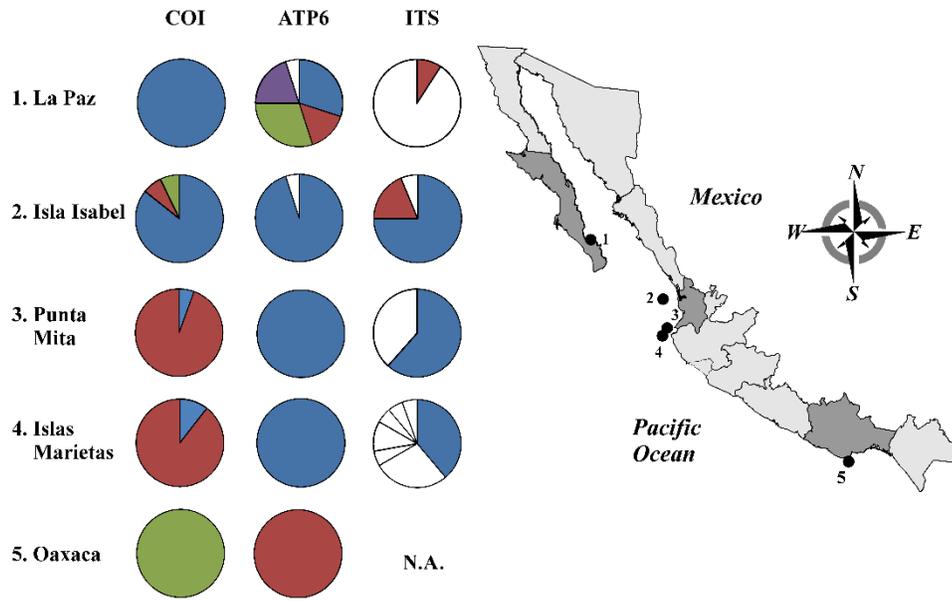


Figura 5. Localidades de muestreo y gráficas de pastel que representan la distribución geográfica y frecuencias haplotípicas para cada gen mitocondrial (COI y ATP6) y nuclear (ITS).

2.3.2. Estructura genética

Los patrones contrastantes de la variación genética espacial generaron fuerte diferenciación genética altamente significativa a través del PM en los tres genes ($\Phi st_{COI} = 0.878$, $p < 0.0001$; $\Phi st_{ATP6} = 0.502$, $p < 0.0001$; y $\Phi st_{ITS} = 0.367$, $p < 0.0001$), revelando que un alto porcentaje de la varianza genética se repartió entre las muestras geográficas como lo demuestran los cambios notables en las frecuencias haplotípicas (Figura 4, Tabla 5). Los valores de Φst pareados permitieron identificar las localidades norteña (LP) y sureña (OAX) como las más divergentes estando diferenciadas consistentemente en casi todos los loci. Las dos localidades centrales PM e IM, que están separadas por menos de 10 km, fueron muy similares en los genes del ADNmt, pero significativamente diferenciadas en el ITS. Las localidades centrales II (la más norteña y distanciada ~100 Km), PM e IM, fueron genéticamente similares en el gen ATP6, mientras que en el gen COI II presentó mayor similitud con LP. En el marcador ITS se obtuvieron los valores más bajos de Φst y los valores de Φst pareados revelaron diferencias significativas entre todas las localidades (Tabla 6).

Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con los marcadores mitocondriales (COI y ATP6) y nuclear (ITS) de *Cliona vermifera* del Pacífico mexicano.

GEN	FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	% DE VARIACIÓN
COI	Entre poblaciones	4	39.80	87.83
	Dentro de poblaciones	68	6.45	12.17
	Total	72	46.25	
	ϕ_{st}	0.878	$p < 0.0001$	
ATP6	Entre poblaciones	4	19.52	50.25
	Dentro de poblaciones	94	21.85	49.75
	Total	98	41.37	
	ϕ_{st}	0.502	$p < 0.0001$	
ITS	Entre poblaciones	3	24.51	36.77
	Dentro de poblaciones	54	47.25	63.23
	Total	57	71.76	
	ϕ_{st}	0.367	$p < 0.0001$	

Tabla 6. Los valores pareados de los índices de fijación molecular (ϕ_{st}) entre muestras de *Cliona vermifera* en el Pacífico mexicano en dos genes mitocondriales (COI y ATP6) y uno nuclear (ITS). Negritas: Significancia después de corrección de Bonferroni ($\alpha = 0.05$); N.A.: no hay datos. LP, La Paz; II, Isla Isabel; PM, Punta Mita; IM, Islas Marietas; OAX, Oaxaca.

Localidades	LP			II			PM			IM	
	COI	ATP6	ITS	COI	ATP6	ITS	COI	ATP6	ITS	COI	ATP6
II	-0.011	0.206	0.640								
PM	0.929	0.214	0.322	0.709	0.000	0.330					
IM	0.865	0.214	0.447	0.653	0.000	0.316	-0.040	0.000	0.302		
OAX	1.000	0.442	N.A.	0.883	0.951	N.A.	0.982	1.000	N.A.	0.966	1.000

En general, los patrones geográficos fueron notables en el análisis de ordenamiento MDS de los valores pareados de F_{st} (Figura 5). La localidad OAX se observa en la periferia y ampliamente separado de las otras localidades en los dos genes mitocondriales. El mismo patrón se observó en LP para todos los genes.

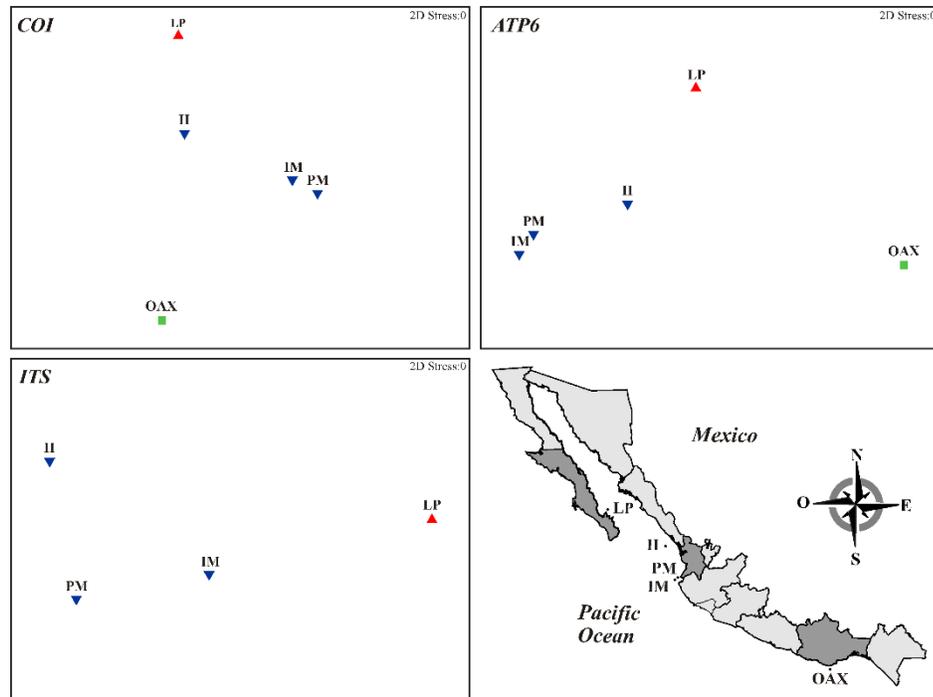


Figura 6. Representación de los patrones geográficos de diferenciación genética mediante el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (MDS), con los dos marcadores mitocondriales (COI y ATP6) y nuclear (ITS).

El aislamiento por distancia fue significativo en los dos genes mitocondriales; la correlación de las distancias genéticas con las geográficas resultó con tendencias positivas y pendientes pronunciadas en todos los genes ($r = 0.554$, $p = 0.00$ para COI; $r = 0.795$, $p = 0.02$ para ATP6). La correlación realizada con los datos del ADNn (ITS) reveló una tendencia positiva pero no significativa ($r = 0.930$, $p = 0.21$) presumiblemente por el número de comparaciones pareadas (Figura 6).

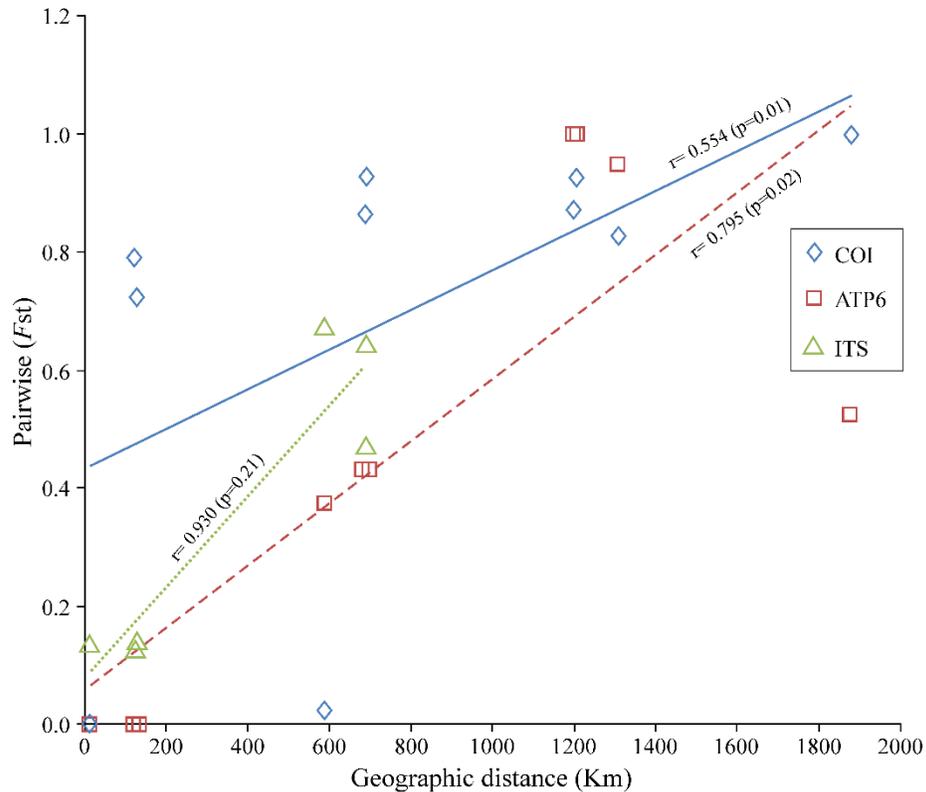


Figura 7. Prueba de aislamiento por distancia de *Cliona vermifera* en el Pacífico mexicano. Gráfica de dispersión de puntos de las distancias genéticas (F_{st}) de los marcadores mitocondriales (COI y ATP6) y nuclear (ITS) en función de la distancia geográfica (km).

2.4. Discusión

Los patrones de diversidad y estructura genética revelados por los marcadores mitocondriales y uno nuclear en poblaciones de *C. vermifera* en el PM indican la influencia de barreras para la dispersión actuando a diferentes escalas espaciales y un patrón genético prevaeciente de aislamiento por distancia. La comprensión de los mecanismos que determinan estos patrones es fundamental para evaluar la amenaza de esta esponja en los arrecifes de coral ante el cambio climático. Este estudio ayudará a futuros muestreos genéticos y geográficos, particularmente en términos de nuevos loci, por ejemplo los microsatelites, lo cual ayudará a superar las limitaciones actuales de los marcadores moleculares.

2.4.1. Patrones de variabilidad genética

Las secuencias de ADN de *C. vermifera* presentaron bajos niveles de diversidad. Los genes mitocondriales (COI y ATP6) fueron los menos variables, en consistencia con la baja tasa mutacional mitocondrial característica del filum Porifera (Dailianis *et al.*, 2011). Se ha argumentado que esa baja tasa es el resultado de un largo periodo generacional acoplado con una baja tasa metabólica (Wörheide, 2006). COI fue el más conservado de los dos genes mitocondriales, como se ha observado en otras especies, como es el caso de las esponjas del Mediterráneo *Crambe crambe* (Duran *et al.*, 2004 c), y las esponjas del Indo-Pacífico *Astroclera willeyana* (Wörheide, 2006). Los niveles de diversidad haplotípica del ADNm en *C. vermifera* (a excepción de las secuencias de ATP6 de LP) fueron similares a los encontrados en *Cliona delitrix* ($h_{COI} = 0.639$, $h_{ATP6} = 0.556$) (Rua *et al.*, 2011), a pesar del pequeño número de secuencias y poblaciones analizadas en ese estudio. Los valores tan bajos de diversidad nucleotídica (< 1%) reflejaron la pequeña divergencia existente entre las secuencias de ADN. Comparado con otras esponjas, la diversidad nucleotídica (es decir, el promedio de la divergencia de nucleótidos) de COI en la localidad de II fue mayor que lo reportado en otras especies tales como *Crambe crambe* (Duran *et al.*, 2004c), *Suberites diversicolor* (Becking *et al.*, 2013) y *Astroclera willeyana* (Wörheide, 2006): $\pi = 0.0006$; 0.0006 y 0.00049 , respectivamente). De los tres loci, el ITS mostró la más alta diversidad genética, sin embargo, fue menor que lo reportado en otras esponjas; por ejemplo, en *Suberites diversicolor* se reportó $h = 0.82$ (Becking *et al.*, 2013). La divergencia promedio de las secuencias de ITS encontrada en *C. vermifera* estuvo dentro del rango reportado en otras Porifera del Océano Índico, del Pacífico y del Caribe (ITS1, $\pi = 0.004$, ITS2, $\pi = 0.00369$; (Wörheide *et al.*, 2004), y en Indonesia ($\pi = 0.0008 - 0.0056$; (Becking *et al.*, 2013). Debido a la gran diferenciación encontrada en los genes mitocondriales entre OAX y las otras localidades y a los esfuerzos infructuosos por optimizar las PCR para amplificar la región del ITS, se abandonó este esfuerzo. Esta imposibilidad de amplificar ITS se atribuyó a la presencia de alelos nulos, cuya existencia puede resultar de sustituciones nucleotídicas que afectan el alineamiento del primer con el ADN molde en los individuos de OAX, o bien de la presencia de estructuras secundarias que pueden interferir con la polimerización de ADN en la PCR (Zhang *et al.*, 1994), o a la interferencia producida por el ADN que flanquea la región de

interés (Hansen *et al.*, 1998). Sin embargo, la fuerte diferenciación mitocondrial encontrada (por ejemplo, un solo haplotipo en la población) y la posibilidad de alelos nulos en el locus nuclear, apuntan a la existencia de aislamiento reproductivo significativo en las esponjas de OAX que pueda estar favoreciendo un proceso de especiación (Blanquer *et al.*, 2009; Blanquer y Uriz, 2010; Duran *et al.*, 2004c).

Para confirmar este supuesto, se realizó un análisis comparativo de los niveles de divergencia haplotípica (intra e inter-específica) con el gen COI; para esto también se utilizaron secuencias de especies congéneres disponibles en el Genbank (*C. chilensis* HM999024-26, *C. celata* HM999027-30, *C. delitrix* HM999041, EF519609, *C. viridis* JX999076, y *C. jullieni* GU169298). Los resultados revelaron que los valores de divergencia intra-específica son un orden de magnitud menor que los valores de divergencia inter-específicas. Además, la divergencia (intra-específica) de *C. vermifera* osciló entre 0.2 y 0.6%, en las otras especies con más de un haplotipo, la divergencia más alta fue de 0.3%, mientras que las divergencias inter-específicas oscilaron entre 2.6 y 12% (Figura 7). Si bien los resultados encontrados son insuficientes para dar conclusiones generales sobre los niveles relativos de la variabilidad intra e interespecífica de COI en *Cliona* spp., concuerdan con lo esperado de una limitada variabilidad intraespecífica en una considerable anagénesis o evolución filética producida por el aislamiento reproductivo por un periodo largo entre linajes específicos. En efecto, no se encontró un traslape entre el rango de divergencias intra e inter-específicas (Figura 7). Aunque los valores de divergencia de los haplotipos de COI encontrados en las muestras de OAX (0.6%) no implican periodos geológicos de aislamiento reproductivo y diferenciación, este valor muy alto de divergencia y la existencia de cambios significativos en las frecuencias haplotípicas apoyan la idea de que las esponjas del sur del PM podrían estar pasando por un proceso de especiación.

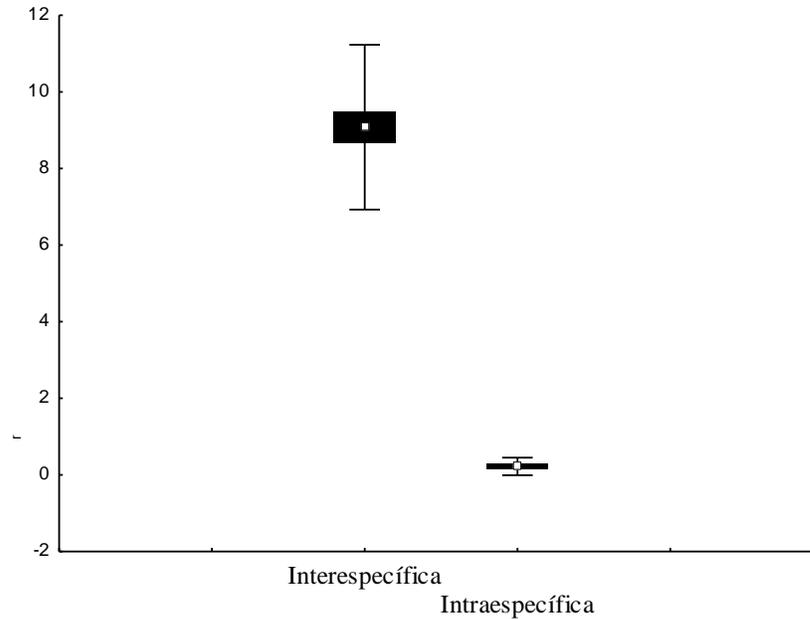


Figura 8. Diagrama de bigotes representando el valor medio, con el error estándar de los datos incluidos dentro de la caja. El diagrama incluye datos de las distancias genéticas inter e intraespecíficas del gen mitocondrial COI de las especies de Cliona: *C. vermifera*, *C. chilensis*, *C. celata*, *C. delitrix*, *C. viridis*, y *C. jullieni*. La distancia máxima intraespecífica de los halótipos de *C. vermifera* fue de 0.006. El análisis incluyó 13 secuencias en las distancias interespecíficas y 11 en las intraespecíficas.

2.4.2. Patrones de estructura genética

Aún con la baja diversidad encontrada en los tres marcadores analizados, se encontraron altos niveles de heterogeneidad genética geográfica entre los sitios de estudio. Los resultados sugieren que existe una fuerte heterogeneidad entre las poblaciones locales de *C. vermifera* en todas las escalas, como se ha encontrado en otras especies de esponjas como *Scopalina lophyropoda* (Blanquer *et al.*, 2009). Sin embargo, los patrones observados en el ADNmt parecen ser más sensibles a la escala espacial, por ejemplo en el gen ATP6 no se encontró diferenciación a escalas de 10-100s de km y sólo se encontró estructura genética a mayores distancias. Con respecto al gen menos variable COI fue menos consistente con la escala, ya que se encontró mayor similitud entre localidades muy distanciadas (II y LP, separadas entre ellas por .500 Km) en relación con localidades más cercanas (II con PM e IM, distanciada por menos de 120 km). Esta discrepancia en la señal de la estructura genética en dos genes relacionados presentes en el ADNmt puede estar más relacionado a sus

diferentes tasas mutacionales. La alta similitud de LP con II en el gen COI sugiere que, al menos en escalas de tiempo evolutivo, puede existir flujo génico entre Baja California y las poblaciones más norteñas del PM. Además, los haplotipos compartidos del ITS (en color rojo, Figura 4) entre las localidades más norteñas (LP e II) también apoyan los patrones observados en las secuencias de COI.

Por otra parte, el hecho de que los dos únicos haplotipos presentes en OAX para cada gen mitocondrial también se encontraron en las localidades más norteñas (COI en II y ATP6 en LP) (Figura 4) en bajas frecuencias, no es evidencia de flujo genético contemporáneo, ya que eso implicaría mecanismos que permitan a la esponja transportarse a ~ 1800 km, lo cual estaría en contradicción con los patrones prevalecientes de alta diferenciación genética y asilamiento reproductivo. Sin embargo, estudios genéticos previos de especies simpátricas de coral [*Pavona gigantea* (Saavedra-Sotelo *et al.*, 2011), quien es hospedero de *C. vermifera*] han reportado una afinidad genética a gran distancia entre las localidades de OAX y LP. Por lo que se ha sugerido una hipótesis histórica para explicar esos patrones que consiste en un alelo que anteriormente se encontraba ampliamente distribuido y que ha sobrevivido en sólo unas cuantas poblaciones periféricas en donde ha alcanzado alta frecuencia (OAX) y ha desaparecido en el resto (Saavedra-Sotelo *et al.*, 2013). Este resultado es relevante por dos razones: primero, porque soportaría la existencia de una señal genética histórica que está influyendo en los patrones actuales de estructura genética en tres especies filogenéticamente no relacionadas pero ecológicamente vinculadas. Segundo, la congruencia en la composición genética de estas especies de arrecifes de coral dominantes en grandes escalas espaciales (> 1800 km) sugiere que la influencia de los procesos en toda la comunidad a gran escala están compartidos en estas poblaciones sésiles.

2.4.3. Dispersión y redes de conectividad de hábitat

Un estudio previo de 4 años determinó que *C. vermifera* incorpora y combina algunas de las ventajas de las esponjas vivíparas (los huevos se incuban antes de convertirse en larvas lecitotróficas), y de las ovíparas (desove de masas de huevos y esperma)

(Bautista-Guerrero *et al.*, 2014). Del mismo modo, a diferencia de las esponjas ovíparas, *C. vermifera* también es capaz de proteger la etapa más sensible de los embriones dentro de una cápsula, lo cual podría aumentar su supervivencia y aumentar su capacidad de dispersión (Bautista-Guerrero *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que la conectividad entre localidades distantes no pueden ser sustentadas por la dispersión de propágulos sexuales únicamente. La dispersión ocasional a gran distancia de fragmentos asexuales originados por tormentas (Battershill y Bergquist, 1990) podría jugar un rol en la dispersión de las esponjas no excavadoras. Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia directa de dispersión a gran distancia en estas esponjas por medio de fragmentos asexuales y la única evidencia muestra que la dispersión asexual es únicamente efectiva a escalas de metros (Zilberberg *et al.*, 2006). Además, a diferencia de otras especies congéneres, *C. vermifera* es incapaz de invadir una variedad de estructuras calcáreas, tales como conchas de moluscos y tubos de poliquetos (Carballo *et al.*, 2008 a), que podrían viajar por rafting (piedras, escombros, etc.) (Thiel y Haye, 2006), o en los cascos de las barcos (Carballo *et al.*, 2013). En ausencia de una etapa de dispersión planctónica, la expectativa es que los patrones de dispersión realizada tendrán poca congruencia con mecanismos pasivos de dispersión y retención (es decir, las corrientes oceánicas, frentes, remolinos de mesoescala). Es cierto que una mejor comprensión de los procesos biofísicos que contribuyen a los patrones de dispersión observados requiere enfoques interdisciplinarios integrados que incorporen alta resolución de modelos biofísicos y datos empíricos más allá del alcance de este trabajo. La correlación significativa entre las distancias genética y geográfica apunta a un modelo de dispersión de “stepping-stone” y es consistente con una fase larvaria dispersiva de corta duración, así como con la posible existencia de un comportamiento filopátrico en *C. vermifera*. Esos resultados son consistentes con los encontrados en la esponja *Scopalina lophyropoda*, que tiene una distribución agregada y comportamiento larval filopátrico (Blanquer *et al.*, 2009).

2.4.4.Limitaciones de los marcadores moleculares

Una revisión reciente sobre la ecología molecular de los Porifera (Uriz y Turon, 2012) pone de manifiesto algunas deficiencias de la utilización de la variación de secuencias de ADN para la evaluación de genética poblacional, incluyendo la falta de fiabilidad para detectar patrones genéticos intraespecíficos debido a la baja tasa mutacional del ADNmt y a la existencia de variación intragenómica en el ADNr nuclear. Nuestros resultados corroboran el bajo nivel de variación del ADNmt (COI y ATP6), sin embargo, ambos genes mostraron fuertes cambios en la frecuencia haplotípica a lo largo de la región de estudio. De hecho, un nivel bajo de polimorfismo impide detectar estructura genética poblacional significativa cuando no lo hay. Esto es resultado del limitado poder estadístico para rechazar la hipótesis nula de no estructura con insuficiente variación (incrementando la probabilidad de cometer el error Tipo II). Sin embargo, si la hipótesis nula es rechazada y se encuentra estructura genética significativa, el tema de bajo polimorfismo es irrelevante, en la medida de la resolución proporcionada por la variabilidad del marcador molecular. La fiabilidad de tales patrones entonces depende de su consistencia con otros loci independientes y más variables, en los cuales se esperaría encontrar un mayor nivel de estructura genética si existiera que en los loci de lenta tasa mutacional. Este fue el caso de *C. vermifera* cuando comparamos los patrones de diferenciación con marcadores de DNAm de lenta tasa mutacional y del ADNr nuclear más polimórfico. Además, el uso de marcadores de ADNmt de lenta tasa mutacional en este estudio se basó en su utilidad para proporcionar evidencia independiente (no ligada) para contrastar los patrones genéticos observados en el ADN nuclear, y también porque a pesar de su lenta tasa mutacional se ha demostrado que proporcionan valiosa información, y al menos uno de ellos (ATP6) no ha sido ampliamente estudiado en genética poblacional de esponjas (Rua *et al.*, 2011) y podría ser más informativo que COI, como lo fue en este caso.

Algunas especies de esponjas han mostrado la presencia de variación intragenómica en el ADNr nuclear, debido a que es una región genética multicopia (Wörheide *et al.*, 2004). Sin embargo, en este estudio no se encontró evidencia de variación intragenómica como dobles picos en algunas bases (SNP) o regiones de lectura traslapada (indel polimórfico) en los cromatogramas de *C. vermifera*. Ciertamente, sería

deseable desarrollar y aplicar en *C. vermifera* marcadores nucleares más polimórficos, tales como microsatélites, para corroborar y ampliar nuestros resultados genéticos. Cabe señalar, que ningún marcador molecular está completamente desprovisto de desafíos. Por ejemplo, microsatélites más variables requieren tamaños de muestra más grandes y son propensos a fallos de amplificación y alelos nulos que complican su interpretación (Chapuis y Estoup, 2007; Uriz y Turon, 2012).

Este capítulo de tesis ha sido publicado en el siguiente artículo científico:

León-Pech, M.G., Cruz-Barraza, J.A., Carballo, J.L., Calderón-Aguilera, L.E., Rocha-Olivares, A. (2015). Pervasive genetic structure at different geographic scales in the coral-excavating sponge *Cliona vermifera* (Hancock, 1867) in the Mexican Pacific. *Coral Reefs*, 34, 887-897.

Capítulo 3.

Patrones de conectividad genética de la Damisela: *Stegastes flavilatus* (Gill, 1862) en comunidades coralinas del Pacífico mexicano

3.1. Introducción. Dispersión y conectividad en peces arrecifales

Inicialmente se consideraba que las poblaciones de peces arrecifales son abiertas a nivel local, sin embargo, diversos estudios han encontrado que a grandes escalas los sistemas arrecifales pueden presentar una estructura metapoblacional de parches aislados conectados entre ellos mediante la dispersión larval (Cowen *et al.*, 2000; Crabbe, 2008; Figueira, 2009; James *et al.*, 2002). Por lo tanto, uno de los temas centrales en la ecología marina concierne al rol de los patrones de conectividad via dispersión larval en la estructuración de las metapoblaciones marinas y la importancia del suministro larval (Armsworth, 2002). En ese sentido, para el estudio de poblaciones locales o parches arrecifales espacialmente estructurados que presentan diferentes características de hábitat se ha adoptado el concepto de poblaciones fuente o sumidero. Es decir, poblaciones capaces de auto-suministrarse y de exportar reclutas o poblaciones que dependen de reclutas de otros parches, respectivamente.

Los peces arrecifales son relativamente sedentarios, tanto en su fase juvenil como adulta, son territoriales y se distribuyen en hábitats naturalmente fragmentados o en parches (sistemas arrecifales), exhibiendo una estructura metapoblacional (Bay *et al.*, 2008; James *et al.*, 2002). Estos parches arrecifales se conectan mediante la dispersión larval de las especies, lo cual tiene implicaciones a escalas ecológicas y evolutivas para las poblaciones (Hogan *et al.*, 2010). Por lo tanto el mayor potencial de dispersión ocurre predominantemente durante la fase larval pelágica durante la cual los organismos están expuestos a las corrientes oceánicas (Bernardi *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 2008). Es por ello que la dispersión larval es un importante medio para la conectividad que favorece el flujo genético en las poblaciones arrecifales (Bradbury *et al.*, 2008; Hogan *et al.*, 2010).

Anteriormente, se consideraba que las poblaciones de peces arrecifales estaban conectadas demográficamente por transporte pasivo de las larvas planctónicas por medio de las corrientes oceánicas (Roberts, 1997). Sin embargo, en las últimas décadas se ha encontrado que la conducta larval y las condiciones oceanográficas (frentes, remolinos, giros) actúan sinérgicamente, limitando la dispersión y favoreciendo el aislamiento poblacional (Cowen *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1999; Taylor y Hellberg, 2003). Por otra parte, estudios previos sobre peces arrecifales que han intentado relacionar la duración larval pelágica (PLD por sus siglas en inglés) con la estructura genética poblacional, han encontrado resultados inconsistentes. En general, se ha observado una mayor influencia en la estructura genética de factores biológicos (hábitat y estacionalidad del desove específico de cada especie) y ambientales (vientos estacionales y patrones de corriente), que de las características de la historia de vida de las especies, como lo es el PLD (Ramon *et al.*, 2008).

Las damiselas del género *Stegastes* han sido utilizadas como modelo de estudio para entender la resolución de la dispersión y retención en las poblaciones de especies arrecifales con ciclos de vida similares para el diseño y monitoreo de áreas marinas protegidas (Ospina-Guerrero *et al.*, 2008; Villegas-Sánchez *et al.*, 2013; Villegas-Sánchez *et al.*, 2010). Aunque las damiselas presentan periodos larvales moderados, que podrían limitar su dispersión (Bernardi *et al.*, 2001), en diversos estudios se ha encontrado alta conectividad y limitada diferenciación genética a grandes escalas espaciales (1000's de km) (Hepburn *et al.*, 2009; Planes y Fauvelot, 2002), lo cual ha sido explicado por las conexiones creadas por las corrientes superficiales y a diversos procesos evolutivos. En contraste, otros estudios han documentado alta divergencia genética entre poblaciones separadas a escalas más finas (Fauvelot y Planes, 2002; Hepburn *et al.*, 2009; Planes y Fauvelot, 2002; Purcell *et al.*, 2009; Taylor y Hellberg, 2003), lo que se ha relacionado con una combinación de factores que podrían formar barreras para la conectividad genética como son: perturbaciones ambientales como mareas rojas y huracanes (Lacson *et al.*, 1989); el componente conductual (migración vertical de larvas o adultos) (Planes *et al.*, 1994); patrones de circulación oceanográfica complejos; y barreras históricas para el flujo de genes (Chen *et al.*, 2004).

Por otra parte, las estimaciones de los patrones de dispersión entre poblaciones de peces dependen en gran medida de la metodología utilizada, cada una conlleva sus ventajas y ciertas limitaciones. Por un lado, los modelos matemáticos basados en predicciones sobre circulación, transporte de larvas (Cowen *et al.*, 2000, 2002; Schultz y Cowen, 1994) y comportamiento larval, han permitido determinar la existencia de poblaciones cerradas (bajo flujo genético) (Paris y Cowen, 2004). Sin embargo, en muchos casos no se ajustan con las observaciones en campo en cuanto a las distancias de dispersión y distribución de larvas (Mora y Sale, 2011). Por el otro, los análisis genéticos nos han permitido determinar los procesos ecológicos que afectan los patrones de conectividad en poblaciones marinas. Sin embargo, dichos patrones son dependientes de los supuestos que incorporan los métodos analíticos y de la tasa mutacional de los genes utilizados, es por ello que uno de los mayores retos en los estudios de genética poblacional es disponer de marcadores genéticos apropiados, lo suficientemente variables.

En estudios poblacionales de peces arrecifales utilizando aloenzimas se ha encontrado alto flujo genético (poblaciones abiertas) y una poza génica común geográficamente extensa y con altas tasas de dispersión. La región del ADNmt también ha sido ampliamente utilizada en su mayoría con organismos del Indo-Pacífico y Caribe, (Bay *et al.*, 2008; Bernardi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Ramon *et al.*, 2008), en los cuales se han encontrado altos niveles de variabilidad, atribuido a grandes tamaños poblacionales, a la heterogeneidad ambiental y a las características del ciclo de vida que favorecen un aumento rápido de las poblaciones (Chen *et al.*, 2004). También se ha encontrado que los peces arrecifales generalmente presentan una baja estructura genética poblacional que refleja cuellos de botella genéticos asociados con la variaciones climáticas (Fauvelot *et al.*, 2003). Tales resultados se han considerado importantes en la dinámica poblacional de peces arrecifales (Planes *et al.*, 1996; Sale *et al.*, 2006). Así mismo, los cebadores microsatelitales por ser altamente polimórficos tienen el potencial de detectar diferenciación poblacional más sutil y pueden ser más útiles para determinar eventos recientes de aislamiento demográfico y diversidad genética entre poblaciones (Ospina-Guerrero *et al.*, 2008; Wright y Bentzen, 1994).

La comprensión de los patrones de dispersión es fundamental para entender los procesos ecológicos y evolutivos en las especies marinas, lo cual conlleva a mejorar los planes de manejo para la conservación de las poblaciones de peces arrecifales y sus ecosistemas. A pesar de ello, el conocimiento sobre el grado en el cual las poblaciones locales de una metapoblación son cerradas (se auto-suministran) o abiertas (dependen de reclutas de otros lugares) es limitado.



Figura 9. *Stegastes flavilatus*. A) Fase juvenil, b) Fase adulta, © Copyright Gerald Allen, 2006. <http://stri.discoverlife.org/mp/20q?search=Stegastes+flavilatus&l=spanish>

Debido a la relevancia ecológica de las especies de *Stegastes* se han realizado estudios para comprender sus patrones de dispersión y conectividad genética (Hogan *et al.*, 2010; Hogan *et al.*, 2012; Ramon *et al.*, 2008; Thiessen y Heath, 2006; Villegas-Sánchez *et al.*, 2013; Villegas-Sánchez *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2003). El pez damisela *Stegastes flavilatus* Gill, 1862, conocido como “Beaubrummel” o Castañeta azul dorada en el Pacífico mexicano (Figura 8), es una especie común en las rompientes de los arrecifes rocosos, alcanza profundidades de hasta 10 m, es omnívoro territorial y dependiente del sustrato rocoso para reproducirse (Chávez-Comparan *et al.*, 2008; Wellington y Victor, 1989). Se distribuye desde las costas de Baja California hasta el Ecuador, y se ha reportado como una especie dominante en algunas comunidades coralinas (Chávez-Comparan *et al.*, 2008). Su tipo de reproducción es sexual y al igual que sus congéneres, *S. flavilatus* posee una fase larval pelágica que dura entre 20 a 33

días (Wellington y Victor, 1992), periodo en el cual se da el mayor potencial de dispersión.

Las características de historia de vida y el potencial de dispersión de *S. flavilatus*, así como la resolución de los marcadores moleculares empleados en este estudio, ofrecen la oportunidad de evaluar la estructura metapoblacional en organismos de sistemas marinos arrecifales. En este estudio se utilizó un marcador mitocondrial (región control) y 5 loci nucleares (microsatélites) para determinar la estructura genética poblacional y el nivel de conectividad de las poblaciones de *S. flavilatus* del PM. El propósito es probar la hipótesis de panmixia y mediante las diferencias espaciales en las tasas de migración probar si la estructura de las poblaciones de *S. flavilatus* se conforma a un modelo metapoblacional. Las metapoblaciones son poblaciones subdivididas genéticamente que se mantienen a través del tiempo por medio de la colonización y migración de las poblaciones fuente (Figura 9) (Bay *et al.*, 2008).

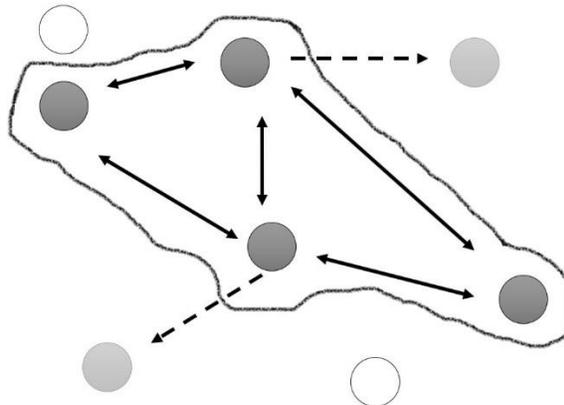


Figura 10. Modelo conceptual de estructura metapoblacional dada por la dispersión y colonización de poblaciones fuente (representadas en círculos más oscuros). Los círculos grises representan las poblaciones sumidero y los círculos blancos representan poblaciones aisladas por barreras físicas o biológicas. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).

3.2. Metodología

3.2.1. Localidades de estudio y recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas por medio de buceo autónomo en seis comunidades coralinas del PM: Bahía de la Paz, Baja California Sur (LP) (24° 02' 40.05" N, 109° 47' 51.01" O); Isla Isabel, Nayarit (II) (21° 50' 37.45" N, 105° 52' 56.23" O); Negritos, Jalisco (NEG) (19° 37' 22.33" N, 105° 17' 31.34" O); Manzanillera, Michoacán (MAN) (18° 21' 20.11" N, 103° 36' 26.39" O); Zacatoso, Guerrero (ZAC) (17° 38' 15.61" N, 101° 42' 8.29" O); Bahías de Huatulco, Oaxaca (OAX) (15° 33' 20.43" N, 96° 7' 53.84" O) (Figura 10). En cada sitio, se recolectaron al azar ~25 organismos de *S. flavilatus* que fueron preservados en etanol al 96% en tubos Eppendorf.

3.2.2. Extracción de ADN, amplificación, secuenciación de ADNmt y genotipificación de loci microsatelitales

El ADN genómico fue extraído del tejido de la aleta caudal de *S. flavilatus* utilizando el Kit DNeasy blood and tissue de QIAGEN (QIAGEN, Hilden, Germany). Para el ADNmt se amplificó la región control y para el ADNn se amplificaron 6 loci microsatelitales heterólogos desarrollados en *Stegastes partitus* (Tabla 7; Thiessen y Heath, 2007; Williams *et al.*, 2003). Los cebadores de la región control fueron CR-A (F) (5'-TTC CAC CTC TAA CTC CCA AAG CTAG-3') (Lee *et al.*, 1995); StDloop.H (R) (5'-CTG GAY AGA YRG CAC GGC ATG G-3') (Ramon *et al.*, 2008).

Las amplificaciones se llevaron a cabo por medio de PCR's en 25µl de volumen de reacción que contenía 250 µM dNTPs, buffer de PCR Perkin Elmer 1X (20 mM Tris HCl, 50 mM KCl y 2 mM MgCl₂), 0.4 µM de cada primer, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) y 1µl de ADN genómico (50 ng/µl). Para las amplificaciones se utilizó el termociclador PTC-200 DNA-Engine thermal cycler (BIORAD, Hercules, CA). Los perfiles de temperatura fueron: 94 °C por 1 min; seguido de 35 ciclos a 93 °C por 30 s; temperatura de anillamiento 52 °C por 60 s; 72 °C por 3 min; seguido por 72 °C por 10 min de extensión final. Para identificar el tamaño y rendimiento de la amplificación se realizó la electroforesis de los productos de PCR en

agarosa al 1.5 % y se purificaron con ExoSAP-IT (ExoSAP-IT, USB Corporation, Cleveland, OH). Posteriormente, para enviarlos a secuenciar en ambos sentidos con los primers de PCR y el equipo BigDye Terminator v.3.1 chemistry in an ABI 3100 Gene Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Las amplificaciones de los loci microsatelitales (GT10, AAT39, AAC33, GATA40, TG13, GGA7) (Tabla 7; Thiessen y Heath, 2007; Williams *et al.*, 2003), se llevaron a cabo con dos técnicas y perfiles de termociclado de acuerdo a los resultados de la primera genotipificación. En el primer método, la mezcla de reactivos para las PCRs fue realizada siguiendo el método descrito por (Schuelke 2000) y el perfil de termociclado fue modificado dependiendo de las condiciones óptimas para cada locus (Tabla 8). El segundo método de amplificación utilizado en GT10, TG13, AAT39, AAC33 y GATA40 se llevó a cabo por reamplificación de un volumen de 10 μ l de reacción que contenía 200 μ M de dNTPs, buffer de PCR (Kapa Buffer A, 1.5 mM Mg); 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) y 1 μ l de ADN genómico (50 ng/ μ l). Con TG13 y GT10 se usó el buffer de PCR Perkin Elmer 1 X ([15 y 20 mM respectivamente]; Tris HCl, 50 mM KCl y 2 mM MgCl₂), y *Taq* DNA polimerasa (New England BIOLABS). Con AAT39 y AAC33 se utilizó 0.5 μ l de Albumina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés). En la primera PCR se agregó cada primer a una concentración final de 0.5 μ M y en la reamplificación se sustituyó el cebador forward con la secuencia universal M13 marcada con un fluoróforo y como el ADN patrón se usó el producto del primer PCR a una dilución de 1:100. Los perfiles de termociclado en este método variaron para cada locus de acuerdo a sus condiciones óptimas de amplificación (Tabla 9).

En ambas técnicas se agregó una extensión de la secuencia universal M13 al marcador forward, para que fuera reconocida por otra secuencia universal M13 marcada con un fluoróforo, en el proceso de amplificación. Para ello se utilizó el termociclador C100 Touch DNA-Engine thermal cycler (BIORAD, Hercules, CA). Finalmente, para identificar el tamaño y rendimiento de la amplificación se realizó una electroforesis de los productos de PCR en agarosa al 2 %. Los productos amplificados fueron mezclados para ser genotipificados (identificación de alelos por medio de su fluorescencia) en un secuenciador automático ABI 3130xl y posteriormente se visualizaron en el programa GeneMarker v.2.4.0 para determinar los alelos de cada genotipo.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores usados para la amplificación de los 6 loci microsatelitales heterólogos; F: fluoróforo utilizado; M R: motivo de repetición; Talla: rango de tamaños alélicos.

GEN	CEBADOR	SECUENCIA (5´- 3´)	F	M R	Talla
GT10^(1a)	<i>SpGT10 F</i> <i>DQ676498 R</i>	GGCCTGTTTTAAAGGTCACCA CACCAACGAGCTACGGTGTA	FAM	GT ₁₀	262- 296
TG13^(1a)	<i>SpTG13 F</i> <i>DQ676497 R</i>	CTTGTTTCCTTGGCTTCTTGG TGATAGTGGCAAGCAATGGA	VIC (1c)	TG ₁₃	248
AAT39^(1b)	<i>SpAAT39 F</i> <i>SpAAT39 R</i>	TGCCAAGTTAAACGTAGACAC CTCCCTTCAGTGATTTTCAGAA	NED	AAT ₁₅	147- 192
AAC33^(1b)	<i>SpAAC33 F</i> <i>SpAAC33 R</i>	ATCCGTTTTCGTGGTCTCAC CCCCGCTTTCCTTCTAAA	VIC	AAC ₁₃	99- 135
GGA7^(1a)	<i>SpGGA7 F</i> <i>DQ676494 R</i>	CGATATGTTTAATGTGAGGAACG TTTCAGGAGGTAATAGTCCACCA	NED	GGA ₇	264
GATA40^(1b)	<i>SpGATA40 F</i> <i>SpGATA40 R</i>	TTGCCTGCTGATAATTAACG ATGCCTCACAATGATGTATATT	PET	GATA ₆ +29	133- 249

(1a) Thiessen y Heath (2007); (1b) Williams *et al.* (2003); (1c) En algunas muestras se usó el NED.

Tabla 8. Condiciones de termociclado para cada locus, con sus respectivas temperaturas de anillamiento, modificado de Schuelke (2000).

	GT10	TG13	AAT39	AAC33	GGA7	GATA40
Precautado	10 m a	10 m a	1 m a	10 m a	1 m a	10 m a
	95°C	95°C	94 °C	95 °C	94 °C	95 °C
	2 m a	1 m a		1 m a		1 m a
	94 °C	94 °C		94 °C		94 °C
	30 ciclos	23 ciclos	21 ciclos	21 ciclos	35 ciclos	23 ciclos
Desnaturalización	15 s a	30 s a	10 s a	30 s a	30 s a	30 s a
	94 °C	94 °C	94 °C	94 °C	93 °C	94 °C
Anillamiento	15 s a	30 s a	10 s a	30 s a	1 m a	30 s a
	47 °C	48 °C	50 °C	50 °C	53 °C	48 °C
Elongación	30 s a	45 s a	10 s a	45 s a	3 m a	45 s a
	72 °C					
		8 ciclos	8 ciclos	8 ciclos		8 ciclos
Desnaturalización		30 s a	10 s a	30 s a		30 s a
		94 °C	94 °C	94 °C		94 °C
Anillamiento		30 s a	10 s a	30 s a		30 s a
		53 °C	53 °C	53 °C		53 °C
Elongación		45 s a	10 s a	45 s a		45 s a
		72 °C	72 °C	72 °C		72 °C
Elongación final	90 s a	2 m a	10 m a	2 m a	10 m a	2 m a
	72 °C					

Tabla 9. Condiciones de termociclado con el método de reamplificación, para cada locus con sus respectivas temperaturas de anillamiento.

	T °C	Tiempo			T °C (2do PCR)
		GT10	TG13 y GATA40	AAT39 y AAC33	
Precaentado	95 °C	10 min	10 min		
	94 °C	2 min	1 min	1 min	
30 ciclos					
Desnaturalización	94 °C	15 s	30 s	10 s	
Anillamiento	* °C	15 s	30 s	10 s	53°C
Elongación	72 °C	30 s	45 s	10 s	
Elongación final	72 °C	90 s	2 min**	10 min	

*T° de anillamiento de GT10 fue de 47°C, de GATA40 59°C y el de los loci restantes fue de 50°C;
**10 min de extensión final para GATA40.

3.2.3. Análisis genéticos de la región control del ADNmt

Las secuencias de la región control fueron analizadas y editadas con el programa CODONCODE ALIGNER v.4.0.4. (CodonCode Corp., Dedham, MA) y se alinearon con la ayuda de MEGA v.5 (Tamura *et al.*, 2011). Los haplotipos fueron identificados con el programa DnaSP v.4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Los siguientes análisis se realizaron con el programa Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Se estimaron los niveles de diversidad genética haplotípica (h) y nucleotídica (π) (Nei, 1987). Se realizó un análisis exploratorio de las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de la región control con una red de parsimonia estadística utilizando el programa TCS v.1.2.1 (Clement *et al.*, 2000). Para examinar la estructura poblacional jerárquica, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA). El índice de fijación molecular Φ_{st} se calculó para probar la hipótesis de panmixia entre las poblaciones, tomando en cuenta la matriz de distancias inter-haplotípicas basada en el modelo de evolución nucleotídica óptimo (HKY) obtenido con el programa JMODELTEST v.2.1.5 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon y Gascuel, 2003). La significancia se calculó con pruebas de permutación y para las pruebas múltiples se ajustó usando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Finalmente, se realizó una prueba de aislamiento por distancia correlacionando las

matrices de distancias genéticas (F_{st}) y geográficas (km) entre localidades mediante una prueba de Mantel como está implementada en el programa IBDWS empleando 10,000 aleatorizaciones (Jensen *et al.*, 2005).

3.2.4. Análisis genéticos de loci microsatelitales

Para caracterizar cada locus microsatelital en cada localidad se cuantificó el número de alelos (A) y se calculó la riqueza alélica (r_A) estandarizada a un tamaño mínimo de muestra mediante el programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995). Se estimó la heterocigocidad observada (H_o) y la esperada (H_e de acuerdo al equilibrio de Hardy Weinberg) con el programa Microsatellite Toolkit K (Park, 2001). Para probar si las frecuencias genotípicas de cada locus se encuentran en equilibrio, se probó la hipótesis nula de equilibrio en el proceso de mutación por locus en cada muestra, utilizando la prueba exacta de Hardy-Weinberg (H-W) y para estimar su nivel de significancia se utilizaron los algoritmos propuestos por Guo y Thompson, (1992) implementados en el programa GENEPOP v.3.4 (Raymond y Rousset, 1995). Para las pruebas múltiples se ajustó la significancia utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Para medir el nivel de endogamia existente en cada localidad para cada locus se obtuvo un índice de endogamia (F_{is}) que calcula el grado de consanguinidad entre individuos mediante el programa FSTAT v.2.9.3.2. Para verificar la existencia de alelos nulos en cada uno de los loci en el proceso de amplificación, utilizamos el programa Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Con la finalidad de evaluar el grado de diferenciación genética poblacional en *S. flavilatus* en el PM, realizamos un AMOVA para evaluar los niveles de diferenciación genética utilizando dos índices análogos: F_{st} , basado solamente en las frecuencias alélicas, y R_{st} , que también toma en cuenta la información molecular representada por las diferencias entre tamaños alélicos. Para estas pruebas se usó el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). La significancia del AMOVA fue evaluada mediante pruebas de permutación. Para las pruebas múltiples se ajustó la significancia utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Para complementar el análisis de diferenciación genética basado en un modelo genético y en simulación estadística se

realizó un análisis bayesiano de estructura, mediante el programa Structure v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), el cual se basa en el análisis de genotipos multilocus agrupando los genotipos en un número K de probables subpoblaciones. El programa asume equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento dentro de cada subpoblación, además de que permite incluir información acerca del origen geográfico de las muestras. Los parámetros de corrida fueron un periodo de calentamiento de 10,000; 500,000 Cadenas de Markov, un modelo ancestral de mezcla (admixture); frecuencias alélicas independientes; y 6 iteraciones. El número de grupos o subpoblaciones (K) se estimó con el programa Structure Harvester v.0.6.93 (Earl y VonHoldt, 2012). Para el cálculo de delta K , el programa se basa en la tasa de cambio en la probabilidad de que los datos provengan de K subpoblaciones calculando dicha probabilidad para un número creciente de valores de K (Evanno *et al.*, 2005). Se realizó la prueba de aislamiento por distancia; correlacionando las matrices de distancias genéticas (F_{st}) y geográficas (km) entre localidades mediante la prueba de Mantel implementada en el programa IBDWS, empleando 10,000 aleatorizaciones (Jensen *et al.*, 2005).

Para evaluar el patrón de flujo genético, estimamos simultáneamente los tamaños poblacionales efectivos ($\theta = 2Ne\mu$) y el flujo genético ($M = m/\mu$) en el programa MIGRATE v.2.1.3 (Beerli, 2012). Este programa infiere parámetros genéticos poblacionales a partir de datos genéticos estimando los parámetros (P) y su probabilidad condicional dada los datos genéticos (D) [es decir: Prob ($P|D$)]. Para estimar la tasa de migración asimétrica entre poblaciones, se emplea una expansión de la teoría de la coalescencia considerando las mutaciones históricas, genealogía y los distintos tamaños de las subpoblaciones, asumiendo una tasa de mutación constante (μ). Para este análisis se utilizó el método bayesiano con una distribución previa uniforme (Uniform prior distribution), una cadena larga (50,000 genealogías calculadas) y los primeros 250,000 árboles fueron ignorados (burn-in).

3.3. Resultados

3.3.1. Región control del ADNmt

El éxito de amplificación de esta región del ADNmt fue del 100 %. Sin embargo, el número de individuos en las localidades de MAN y ZAC fue bajo debido a que fueron muestras donadas y no fue posible realizar otras salidas de campo.

3.3.1.1 Diversidad genética

La región control amplificada fue de 475 pb; en el alineamiento de todas las secuencias se detectaron 25 sitios polimórficos que generaron 26 haplotipos, de los cuales 18 fueron privados. Un haplotipo fue el más abundante y común en todas las localidades y no se encontró un patrón filogeográfico en la distribución de haplotipos (Figura 10). En la red haplotípica presentada en la figura 10, se observa una topología característica de poblaciones en expansión (Eguiarte *et al.*, 2007), un solo haplotipo ampliamente distribuido y abundante (haplotipo 1). Los valores de diversidad fueron consistentes en todas las localidades a excepción de MAN donde se obtuvieron valores muy bajos ($h = 0.22$ y $\pi = 0.0005$), ya que se encontraron 2 haplotipos únicamente, lo cual puede estar relacionado al pequeño tamaño de muestras. Isla Isabel fue la localidad con mayor diversidad ($h = 0.77$ y $\pi = 0.003$) (Tabla 10).

Tabla 10. Niveles de diversidad en la región control de *Stegastes flavilatus* del Pacífico mexicano. n, número de individuos analizados; A, número de haplotipos; h , diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; LP, La Paz; II, Isla Isabel; NEG, Negritos; MAN, Manzanillera; ZAC, Zacatoso y OAX, Oaxaca.

	LP	II	NEG	MAN	ZAC	OAX	TOTAL
n	24	21	20	9	13	18	105
A	10	8	6	2	7	8	26
h	0.66	0.77	0.57	0.22	0.73	0.69	0.66
π	0.002	0.003	0.001	0.0005	0.003	0.002	0.002

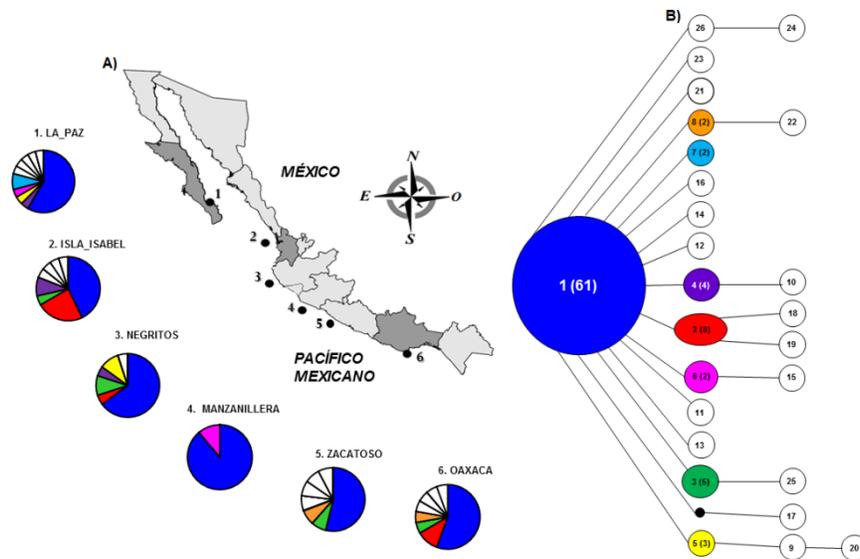


Figura 11. A) Gráficas de pastel representando la distribución geográfica y frecuencias haplotípicas de la región control de *Stegastes flavilatus* del Pacífico mexicano. B) Red de parsimonia estadística de haplotipos de la región control de *S. flavilatus* del PM. La red muestra las relaciones entre los 26 haplotipos encontrados en *S. flavilatus*. Cada haplotipo está representado con un círculo; el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos con ese haplotipo, que está especificado entre parentesis para los que se encontraron más de una vez; los haplotipos fueron numerados en orden de abundancia decreciente. Los círculos blancos son haplotipos únicos y privados (se presentaron en una población). Las líneas que conectan los círculos representan un paso mutacional. El círculo negro pequeño representa un haplotipo intermedio inferido que no fue encontrado en la muestra. Los haplotipos en A están coloreados de acuerdo a B incluyendo a los haplotipos privados representados en color blanco.

3.3.1.2 Estructura genética

Los valores de Φ_{st} fueron bajos y no significativos ($\Phi_{st} = 0.00633$, $p = 0.243$) por lo cual no se rechaza la hipótesis nula de panmixia mitocondrial matrilineal en las poblaciones de *S. flavilatus* del PM. Con el uso de comparaciones pareadas entre las localidades no se detectaron diferencias significativas. Finalmente, en la prueba de aislamiento por distancia no se encontró correlación significativa entre las distancias genéticas (F_{st}) y las geográficas ($r = 0.411$, $p = 0.169$).

3.3.2. Loci microsatelitales

Se amplificaron con éxito 6 loci microsatelitales heterólogos de los cuales dos fueron monomórficos (TG13 y GGA7). Por lo tanto, los análisis subsecuentes se realizaron con los 4 loci que presentaron polimorfismo.

3.3.2.1 Diversidad genética

El número de alelos no fue muy variable entre los loci analizados (12-15) a excepción de GATA40 que presentó el mayor número de alelos (27). La riqueza alélica estandarizada a un tamaño mínimo de nueve, varió entre 6 (AAC33) y 12.2 (GATA40), a nivel poblacional el promedio fue de ± 8.0 en todas las localidades (Tabla 11).

Tabla 11. Localidades, PP: parámetros poblacionales analizados para cada locus, localidad y promedios; N = tamaño de muestra, A = número de alelos, rA = riqueza alélica.

LOCI MICROSATELITALES						
LOCALIDAD	PP	GT10	AAT39	AAC33	GATA40	PROMEDIO
LP	N	23	24	24	24	24
	A	12	11	7	17	11.75
	rA	8.5	7.4	4.7	11.1	7.93
II	N	20	21	21	21	21
	A	9	12	9	20	12.5
	rA	7.2	8.8	6.5	12.3	8.7
NEG	n	20	20	20	20	20
	A	9	10	8	17	11
	rA	7.2	8.1	6.1	11.2	8.15
MAN	n	10	9	10	10	10
	A	6	9	7	14	9
	rA	5.7	9	6.6	12.9	8.55
ZAC	n	12	13	13	13	13
	A	8	11	8	13	10
	rA	7.3	8.9	6.7	11.2	8.53
OAX	n	25	25	24	25	25
	A	10	11	9	18	12
	rA	6.8	8.8	6.1	11.4	8.23
<i>A TOTAL POR LOCUS</i>		12	15	12	27	
<i>rA POR LOCUS</i>		7.3	8.7	6	12.2	

Los valores en negritas representan las muestras donde se encontraron probabilidades significativas de alelos nulos.

En general, los valores de heterocigosidad genética esperada (H_o) fueron moderados; en promedio, la probabilidad de encontrar un individuo heterocigoto al azar en una muestra fue de 0.60-0.78. Los valores de H_o fueron menores en la mayoría de los loci y en todas las localidades (Tabla 12). De los cuatro loci analizados, únicamente GT10 y GATA40 no presentaron equilibrio de H-W en la localidad de la Paz (Tabla 12). La probabilidad de presencia de alelos nulos no fue significativa en el locus AAC33 para ninguna localidad, mientras que en GATA40 sólo en dos de las seis localidades estudiadas no se encontró significancia (II y OAX). A nivel poblacional II fue la única que no presentó alelos nulos en ningún locus, las cinco localidades restantes presentaron alelos nulos en uno o más loci (Tabla 11). Los coeficientes de endogamia

(*F_{is}*) promedio para cada localidad variaron entre 0.083 y 0.289 (Tabla 12), los valores positivos obtenidos representan un grado de endogamia en las poblaciones. Los loci que no mostraron equilibrio de H-W en alguna localidad presentaron un grado moderado de endogamia (valores positivos).

Tabla 12. Diversidad de loci microsateles, analizados por localidad, coeficiente de endogamia (*Fis*), heterocigosidad esperada (*He*) y observada (*Ho*). Valores de *p* en negritas representan datos significativos en la prueba del equilibrio de H-W después de la corrección de Bonferroni.

LOCALIDAD	LOCI MICROSATELITALES					PROMEDIO
	GT10	AAT39	AAC33	GATA40		
LP	<i>n</i>	23	24	24	24	
	<i>Fis</i>	0.27	0.268	0.269	0.34	0.289
	<i>He</i>	0.888	0.849	0.737	0.940	0.85
	<i>Ho</i>	0.652	0.625	0.542	0.625	0.610
	<i>p H-W</i>	0.0004	0.0022	0.0369	0.0019	0
II	<i>n</i>	20	21	21	21	
	<i>Fis</i>	0.095	-0.061	0.186	0.203	0.106
	<i>He</i>	0.827	0.899	0.815	0.951	0.87
	<i>Ho</i>	0.750	0.952	0.667	0.762	0.783
	<i>p H-W</i>	0.098	0.922	0.416	0.043	0.117
NEG	<i>n</i>	20	20	20	20	
	<i>Fis</i>	0.239	0.029	0.245	0.308	0.206
	<i>He</i>	0.849	0.874	0.790	0.932	0.86
	<i>Ho</i>	0.650	0.850	0.600	0.650	0.688
	<i>p H-W</i>	0.041	0.909	0.453	0.003	0.011
MAN	<i>n</i>	10	9	10	10	
	<i>Fis</i>	0.245	0.278	0.02	0.28	0.211
	<i>He</i>	0.784	0.908	0.816	0.958	0.87
	<i>Ho</i>	0.600	0.667	0.800	0.700	0.692
	<i>p H-W</i>	0.2703	0.0155	1	0.0088	0.0089
ZAC	<i>n</i>	12	13	13	13	
	<i>Fis</i>	0.043	0.212	0.176	0.358	0.201
	<i>He</i>	0.870	0.871	0.834	0.945	0.88
	<i>Ho</i>	0.833	0.692	0.692	0.615	0.708
	<i>p H-W</i>	0.195	0.068	0.398	0.004	0.006
OAX	<i>n</i>	25	25	24	25	
	<i>Fis</i>	0.06	0.207	0.036	0.021	0.083
	<i>He</i>	0.807	0.904	0.777	0.940	0.86
	<i>Ho</i>	0.760	0.720	0.750	0.920	0.788
	<i>p H-W</i>	0.047	0.002	0.549	0.144	0.003
<i>He promedio</i>		0.842	0.896	0.785	0.950	
<i>Ho promedio</i>		0.709	0.759	0.661	0.726	
<i>p H-W</i>		0.0001	0.0001	0.3707	0	

3.3.2.2 Estructura genética

En el análisis de varianza molecular no se encontró diferenciación genética significativa ($F_{st} = 0.0073$, $p = 0.2329$; $R_{st} = 0.0287$, $p = 0.1431$) (Tabla 13). Así mismo, no se detectó diferenciación significativa en las comparaciones pareadas entre localidades.

Tabla 13. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con los 6 loci microsatelitales de *Stegastes flavilatus* del Pacífico mexicano.

INDICE	FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	% DE VARIACIÓN
F_{st}	Entre poblaciones	10.736	0.0123	0.733
	Dentro de poblaciones	371.751	1.689	99.27
	Total	386.595	1.702	
	<i>F_{st}</i>	0.0073	$p = 0.2329$	
R_{st}	Entre poblaciones	7951.441	22.472	2.88
	Dentro de poblaciones	166840.904	758.367	97.12
	Total	174792.345	780.840	
	<i>R_{st}</i>	0.0287	$p = 0.1431$	

En el análisis bayesiano (STRUCTURE) se detectaron dos grupos genéticos (K) más probables (Figura 11). Sin embargo, las dos identidades genéticas identificadas estuvieron distribuidas en igual proporción en todas las localidades estudiadas, revelando la ausencia de un patrón geográfico de diferenciación (Figura 11). Estos resultados son congruentes con los resultados del AMOVA. Debido a que se encontraron valores significativos de probabilidad de presencia de alelos nulos, se realizó un AMOVA con la corrección de alelos nulos y se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la ausencia de estructura genética significativa ($F_{st} = 0.0069$, $p = 0.1755$; $R_{st} = 0.0293$, $p = 0.1319$). La prueba de aislamiento por distancia también fue congruente con los resultados de estructura genética, ya que no se encontró correlación significativa entre los valores pareados de F_{st} con la distancia geográfica ($r = 0.0960$, $p = 0.4390$).

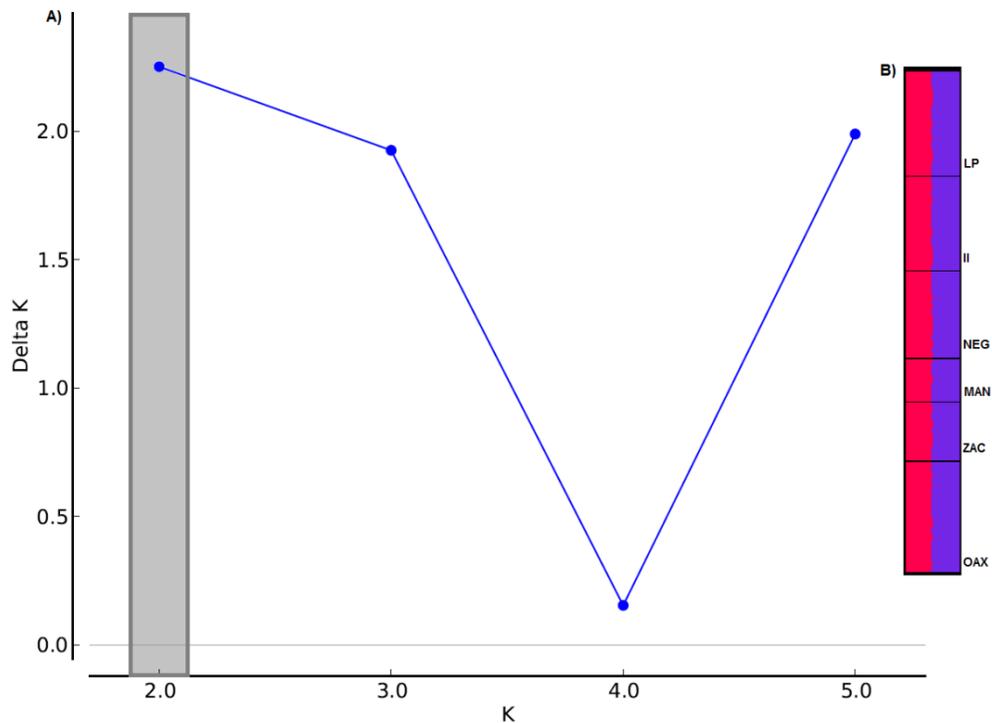


Figura 12. A) Probabilidad de grupos en equilibrio genotípico y de ligamiento obtenido mediante STRUCTURE utilizando el método propuesto por Evanno *et al.* (2005). B) Probabilidad de pertenencia de cada individuo a un posible grupo genético identificado (asignado a un color).

3.3.2.3. Patrón de flujo genético

Se realizaron 11 simulaciones con el programa Migrate-n que arrojaron valores muy altos de tasas de migración. Por lo tanto, para corroborar la existencia de flujo asimétrico y detectar la dirección del nivel más alto de flujo, se eligieron las cinco simulaciones que fueron consistentes en la dirección y magnitud del flujo ($M = m/\mu$) y se categorizaron de acuerdo al orden de magnitud de los valores de las tasas de migración. Con ésta categorización fue posible detectar tres diferentes intensidades: **1** los valores mínimos (10^4), **2** los intermedios (10^5) y **3** los valores máximos (10^6 o más) (Tabla 14).

La mayoría de las localidades comparadas presentaron valores que se encuentran dentro de la categorización **3** (18 de 30); cuatro localidades comparadas presentaron valores categorizados en **2** y ocho presentaron valores categorizados en **1** (Tabla 14). El patrón geográfico general evidenció que la localidad de OAX es la de mayor flujo hacia todas las localidades estudiadas, así como II con excepción del flujo hacia OAX.

El tamaño efectivo poblacional (θ) fue alto en la mayoría de las localidades. LP e II fueron las de mayor tamaño efectivo; NEG fue la localidad que presentó el valor más bajo de θ (Tabla 14).

Tabla 14. Estimaciones de tamaños poblacionales efectivos ($\theta = 2 N_e \mu$) y tasas de migración entre poblaciones ($M = m/\mu$) de *Stegastes flavilatus*. Los números entre paréntesis y en negritas representan las categorías que se asignaron a los valores de M de acuerdo a las diferencias en el orden de magnitud: (1) Mínimo; (2) Intermedio y (3) Máximo.

	N	θ	$M = m/\mu$					
			1	2	3	4	5	6
1. LP	24	5.973	0	2558915 (3)	106920 (2)	86564 (1)	129647 (2)	1684210 (3)
2. II	21	6.605	4812866 (2)	0	82993 (1)	251271 (2)	71788 (1)	8879013 (3)
3. NEG	20	0.049	6106928 (3)	2105653 (3)	0	2041357 (3)	1070398 (3)	2951965 (3)
4. MAN	10	5.052	3361379 (3)	4217071 (3)	7857016 (3)	0	5175803 (3)	4400888 (3)
5. ZAC	13	4.747	1378377 (3)	3989068 (3)	8186974 (3)	7048103 (3)	0	5948583 (3)
6. OAX	25	2.848	60583 (1)	50145 (1)	58133 (1)	63649 (1)	80286 (1)	0

3.4. Discusión

3.4.1. Patrón de diversidad genética de *Stegastes flavilatus* en el PM

En general, la diversidad encontrada en la región control de *S. flavilatus* fue alta, sin embargo, fue menor que lo reportado en otros estudios de peces damisela (pomacentridos) en el Indo-Pacífico Oriental ($h = 0.986$ para *Stegastes fasciolatus*, $h = 0.939$ para *Dascyllus albisella* (Ramon *et al.*, 2008); $h = 0.99$ para *Dascyllus trimaculatus* (Bernardi *et al.*, 2001), incluyendo otras especies de peces arrecifales del Pacífico Occidental ($h = 0.944$ $\pi = 0.0203$ para *Thalassoma hardwicky* (Chen *et al.*, 2004), Mientras que en *Thalassoma lucasanum* en el PM se encontró una variabilidad reducida y menor a la de este estudio ($h = 0.124$; $\pi = 0.00059$, (Dominguez-Rivera, 2011) no consistentes con la ubicuidad y gran abundancia de la especie. Esos valores bajos de diversidad han sido relacionados con la interacción entre factores ecológicos y evolutivos (cuellos de botella, estrategias de reproducción, reciente colonización, y bajas tasas de auto-reclutamiento), así como a las características del hábitat, que podrían estar propiciando una diversidad genética mitocondrial reducida por deriva y generar la dominancia de algunos haplotipos (Figura 10) (Dominguez-Rivera, 2011).

De manera general en peces arrecifales, se ha encontrado alta diversidad haplotípica en relación a la diversidad nucleotídica, así como fue observado en este estudio. Algunos autores mencionan que es un indicio de una rápida expansión demográfica posterior a un cuello de botella, que no permite que pase el tiempo suficiente para acumular mutaciones (Chen *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2008; Fauvelot *et al.*, 2003).

Por otro lado, la alta diversidad haplotípica en peces arrecifales ha sido relacionada con la influencia de diversos factores (Chen *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2008; Fauvelot *et al.*, 2003; Fauvelot y Planes, 2002). En primer lugar, un tamaño poblacional grande que permita altos niveles de diversidad genética y las características de historia de vida de las especies como tiempos generacionales cortos, tallas pequeñas y rápida maduración. En segundo lugar, en poblaciones donde la migración es alta en periodos relativamente cortos es posible que señales genéticas de reducción poblacional desaparezcan (Domingues *et al.*, 2008). Así mismo, se ha encontrado evidencia de que

la selección natural puede estar actuando en esta región del ADNmt y por lo tanto puede estar influenciando en la variabilidad genética (Haney *et al.*, 2007).

En cuanto a los niveles de variabilidad de los loci microsatelitales de *S. flavilatus*, fueron menores a los encontrados en sus congéneres del Caribe, en los cuales se utilizaron algunos de los loci empleados para este estudio. En *Stegastes partitus* del Caribe colombiano se reportó un promedio de 31 ± 6 alelos/locus y un rango de 21 a 42 (Ospina-Guerrero *et al.*, 2008); en el Caribe mexicano, se encontró un promedio de 60 alelos por locus y un rango de 22 a 127; en el Caribe mexicano y golfo de México se detectaron un promedio de 49 alelos por locus y un rango de 12-80 (Villegas-Sánchez *et al.*, 2010, 2013 respectivamente); y con *Stegastes acapulcoensis* en el PM se obtuvo un promedio de 32.75 alelos y un rango de 25 a 49 alelos por locus (Chassin-Noria y Urbiola-Rangel, 2013). En general los valores de *Ho* fueron moderados, sin embargo, en promedio se encontró un déficit de heterocigosidad en todas las localidades.

El déficit de heterosigocidad ha sido explicado por causas técnicas como la subestimación de alelos al momento de la genotipación omitiendo picos considerados como fantasmas; la dominancia de alelos pequeños (Ospina-Guerrero *et al.*, 2008); o la presencia de alelos nulos (Addison y Hart, 2005). De esas asociaciones, la presencia de alelos nulos podría ser más cercana a nuestros resultados, ya que en tres de los cuatro loci se encontró probabilidad significativa de presentar alelos nulos en alguna localidad. Otras explicaciones se refieren a procesos biológicos como la endogamia, el efecto Wahlund o el apareamiento no aleatorio (Addison y Hart, 2005; Ospina-Guerrero *et al.*, 2008). En este caso el efecto Wahlund se descarta ya que no se encontró estructura genética significativa entre localidades. Por otra parte, en algunas especies como en *S. partitus*, se ha considerado el apareamiento no aleatorio como posible causa del déficit de heterocigosis debido al comportamiento sexual de la especie que involucra la selección del macho por parte de la hembra (Ospina-Guerrero *et al.*, 2008). En cuanto a la endogamia, en promedio se encontraron valores moderados de *Fis* (0.106 - 0.289) a excepción de la localidad de OAX que fue muy bajo e II que presentó un valor negativo de *Fis* (exceso de heterocigotos o exogamia).

3.4.2. Estructura genética

La falta de diferenciación genética significativa fue consistente en los resultados del AMOVA, tanto en el análisis del ADNmt como en los loci microsatelitales, por lo cual no se rechaza la hipótesis de panmixia. Debido a que no se encontró un patrón geográfico de diferenciación genética a lo largo de más de 1800 km, se sugiere que las poblaciones de *S. flavilatus* en el Pacífico mexicano presentan alta conectividad.

Estas señales de alta conectividad también se han encontrado en otras especies de peces distribuidas en las comunidades arrecifales del Pacífico mexicano, a escalas similares con *Thalassoma lucasanum* (Dominguez-Rivera, 2011); y a escalas menores con *Stegastes acapulcoensis* (Chassin-Noria y Urbiola-Rangel, 2013). De manera general sus resultados se han asociado a factores ecológicos como la demografía histórica y condiciones del hábitat, así como a factores biológicos como son las estrategias reproductivas y el periodo larval.

En diversos estudios de especies congéneres del Caribe, donde se han empleado métodos genéticos directos e indirectos, se ha encontrado estructura genética a diferentes escalas espaciales debido al autoreclutamiento y a la retención local. Así mismo, se ha encontrado variación en los patrones de diferenciación a escala temporal y en diferentes etapas de vida de las especies. Sus resultados han sido relacionados a procesos ecológicos, predominantemente a un efecto de lotería y a la contribución larval que puede variar en el tiempo debido a procesos estocásticos como el flujo oceanográfico (Christie *et al.*, 2010; Hogan *et al.*, 2010; Hogan *et al.*, 2012; Villegas-Sánchez *et al.*, 2010;).

Con base en lo anterior, es importante tener en cuenta la dificultad de estimar la estructura poblacional solo con la diferenciación genética debido a los efectos relativos de la colonización y migración. Así mismo, las posibles limitaciones del índice de F_{st} para interpretar la estructura genética en organismos con alto flujo genético, puede ser superado tomando réplicas a escala temporal e incorporar métodos empíricos para evaluar la existencia de un error de muestreo y determinar cual es el índice de diferenciación más apropiado para el análisis de los datos (Knutsen *et al.*, 2003).

Con respecto a la falta de correlación entre la distancia genética con la distancia geográfica, se ha asociado a la falta de disponibilidad de sitios de asentamiento en un sistema de islas por lo tanto a pesar de tener diferentes periodos larvales, parecen tener la misma propabilidad de encontrar un sitio disponible (Fauvelot *et al.*, 2003). Por otro lado, es posible que se deba a que las especies arrecifales pueden presentar eventos de reducción y extensión o migraciones asimétricas en poblaciones locales que favorezcan una estructura genética que no está determinada por la distancia entre sus poblaciones, si no por las tasas de migración y la demografía histórica de la especie, lo cual es característico en especies con alta capacidad de dispersión (Bay *et al.*, 2008).

3.4.3. Patrón de migración asimétrico

La magnitud y dirección de flujo genético encontrados sustentaron la falta de diferenciación genética en las poblaciones de *S. flavilatus* ya que los valores de las tasas de migración fueron muy altas en general. Aunque no se encontró un patrón geográfico de diferenciación genética significativa en este estudio, los valores de las tasas de migración mostraron un flujo asimétrico que sugiere una desviación del modelo de isla, el cual asume que las tasas de migración son iguales entre las poblaciones, ya que fue notable y estricto el patrón de conectividad asimétrico de OAX hacia el resto de las localidades (Tabla 14). La alta intensidad de migración de OAX hacia las otras localidades podría estar asociado con la Corriente Occidental Mexicana (COM). Esta corriente se origina en el Golfo de Tehuantepec y se dirige hacia el norte hasta encontrarse con la Corriente de California (CC) (Kessler, 2006), favoreciendo un flujo intenso de larvas hacia esa misma dirección, tomando en cuenta que el periodo larval pelágico de *S. flavilatus* es de 20 a 23 días (Wellington y Victor, 1992).

En contraparte, la alta migración de las localidades más norteñas hasta ZAC (p. ej., LP→ZAC, también podría estar asociada a los patrones de flujo de la COM, ya que esta corriente cambia la dirección de su flujo hacia el sur durante la primera mitad del año (Kessler, 2006). No obstante, es posible que otras condiciones oceanográficas particulares como el giro de Tehuantepec disminuyan la tasa de migración hasta la

localidad más sureña (OAX), pues aún con valores altos de flujo, disminuyeron en 2 ordenes de magnitud (Tabla 14).

Las tasas de migración menores (2 ordenes de magnitud) que no se asociaron a las características oceanográficas o a la distancia geográfica (p. ej., NEG y ZAC→II, tabla 14) pueden corresponder a condiciones ambientales que no permiten a las larvas asentarse ya que se ha encontrado una fuerte correspondencia del post-reclutamiento de los peces damisela con el hábitat (Bernardi *et al.*, 2001; Wellington y Victor, 1992). Así mismo, existen estudios de peces arrecifales donde no se ha detectado relación de la diferenciación genética con el periodo larval planctónico, las características oceanográficas o la distancia geográfica. En contraste, han detectado una estructura poblacional que se ajusta al modelo de isla, donde el intercambio larval es aleatorio tanto a escala temporal como espacial, debido a la falta de disponibilidad de sitios de asentamiento en un sistema insular. A pesar de que las especies pueden presentar diferentes periodos larvales, tienen la misma propabilidad de encontrar un sitio disponible (Fauvelot *et al.*, 2003; Fauvelot y Planes, 2002).

En resumen, los resultados genéticos mostraron evidencia de que las poblaciones de *S. flavilatus* del Pacífico mexicano presentan una alta conectividad a escalas de miles de km, lo cual indica que factores biológicos como el periodo larval le confieren una alta capacidad de dispersión, en consecuencia el flujo larval puede ser mediado por las condiciones oceanográficas particulares en algunas regiones del Pacífico mexicano.

3.5. Perspectivas

Las conclusiones de este capítulo se generaron de los resultados del análisis realizado con un número limitado de loci microsatelitales, por lo que es recomendable aumentar la cantidad de cebadores. En este sentido, es importante mencionar que a partir de este trabajo, se llevó a cabo la secuenciación masiva (NGS por sus siglas en inglés) de un par de organismos de *S. flavilatus* de la localidad de LP. La NGS se realizó con la plataforma illumina (San Diego, CA), con el modo pired-end, realizada en LANGEBIO, Irapuato, México.

De los datos generados de la NGS se diseñaron 30 loci microsatelitales, de los cuales 24 han amplificado exitosamente (Tabla 15). El uso de éstos marcadores en un futuro permitirá tener mayor resolución en los resultados que se obtengan.

Tabla 15. Loci microsatelitales específicos de *Stegastes flavilatus*, diseñados por medio de la secuenciación de nueva generación.

ID MICROSATELITE	CEBADOR	M R	TALLA
339	SFLA2_02F	AC	196
	SFLA2_02R		
570	SFLA2_05F	AC	328
	SFLA2_05R		
586	SFLA2_06F	AC	306
	SFLA2_06R		
1249	SFLA2_09F	AG	185
	SFLA2_09R		
1	SFLA3_01F	AGC	279
	SFLA3_01R		
127	SFLA3_02F	AGC	320
	SFLA3_02R		
1546	SFLA3_03F	AGC	192
	SFLA3_03R		
1828	SFLA3_04F	AGC	154
	SFLA3_04R		
2635	SFLA3_05F	AAG	259
	SFLA3_05R		
4092	SFLA3_06F	AAC	347
	SFLA3_06R		
4413	SFLA3_07F	AAT	329
	SFLA3_07R		
4433	SFLA3_08F	ATC	305
	SFLA3_08R		
4802	SFLA3_09F	AGC	154
	SFLA3_09R		
5312	SFLA3_10F	AAC	248
	SFLA3_10R		
548	SFLA4_01F	AAAT	197
	SFLA4_01R		
549	SFLA4_02F	AAAG	341
	SFLA4_02R		
2371	SFLA4_03F	AAAC	265
	SFLA4_03R		
3027	SFLA4_04F	AAAC	347
	SFLA4_04R		
3306	SFLA4_05F	AAGG	339
	SFLA4_05R		
3470	SFLA4_06F	AAAT	333
	SFLA4_06R		
3917	SFLA4_07F	AATG	291
	SFLA4_07R		
4539	SFLA4_08F	AAAG	308
	SFLA4_08R		
4630	SFLA4_09F	ACCT	199
	SFLA4_09R		
4723	SFLA4_10F	AAAG	287
	SFLA4_10R		

Capítulo 4.

Análisis comparativo de los patrones de conectividad en especies marinas arrecifales con historia de vida contrastante

4.1. Retos en el estudio de la conectividad: escalas espaciales y temporales

4.1.1. Análisis de la conectividad en especies con diferente historia de vida

Las intensas discontinuidades genéticas intraespecíficas ocurren cuando las barreras a la dispersión (pasadas y/o actuales) permiten la diferenciación y evitan la homogenización genética entre las poblaciones. Por lo tanto, los patrones geográficos de estructura genética dentro de una especie proporcionan valiosas señales de los niveles y dirección de la conectividad entre las poblaciones, ya sea histórica o contemporánea (Pelc *et al.*, 2009).

Así mismo, las especies relacionadas ecológicamente con historia de vida contrastantes responden al ambiente a diferentes escalas espaciales y temporales, lo que se reflejará tanto en los procesos ecológicos como evolutivos (Gaggiotti y Vetter, 1999). Esto debido a que la historia de vida específica de cada especie tiene importantes implicaciones sobre cómo responden a distintas barreras que limitan el flujo genético. Por ejemplo, las especies con larvas planctónicas, en especial las larvas planctotróficas, tienen un espectro de flujo muy amplio (Waples, 1998) y debido a su alto flujo genético, las poblaciones rápidamente se homogenizan mostrando baja o nula estructura genética. Sin embargo, las condiciones pueden afectar directamente la conectividad, como es el caso del escaso intercambio de migrantes a corta distancia a través de un frente oceanográfico que actúa como barrera o, contrariamente, la alta conectividad a gran distancia mediada por una fuerte corriente (White *et al.*, 2010). En este sentido, las especies con dispersión planctónica frecuentemente reflejarán la conectividad oceanográfica actual (Grosberg y Cunningham, 2000), mientras que las especies con baja capacidad de dispersión tenderán a reflejar patrones históricos resultantes de

grandes escalas de tiempo. Esto, debido a que su bajo nivel de flujo genético permite que la señal de separación histórica persista por muchas generaciones (Hellberg *et al.*, 2002).

Por lo tanto, en los sistemas marinos los patrones geográficos de estructura genética podrían ser congruentes en especies con potencial de dispersión similar pero diferirán en especies con potencial de dispersión contrastante.

4.1.2. Enfoque genético para medir conectividad

Como se ha visto en los capítulos anteriores, el flujo genético se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra, siempre y cuando los individuos se reproduzcan en la población que migraron y así contribuyan a la conectividad genética poblacional.

Los métodos genéticos para estimar el nivel de flujo genético entre poblaciones pueden ser directos o indirectos. Los métodos directos, se basan en experimentos que miden el grado de dispersión de gametos, por ejemplo la asignación de individuos en las poblaciones de origen, o también pueden hacerse pruebas de paternidad y después cuantificar el patrón de movimiento de genes (Eguiarte *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2005).

Las posibles limitaciones de estos métodos es que se tiende a subestimar la frecuencia de la dispersión a grandes escalas espaciales. Además, los eventos de extinción y recolonización no son considerados como una fuente de flujo genético, por lo tanto no permiten detectar posibles eventos que pudieran estar influyendo en la estructura poblacional (Eguiarte *et al.*, 2007).

Los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos más recientes proporcionan una mayor precisión y con ellos es posible inferir tasas de migración entre poblaciones. Sin embargo, se ha encontrado que estas pruebas son más útiles en la detección de patrones cuando la conectividad es baja (Waples y Gaggiotti, 2006).

Los métodos indirectos están enfocados en identificar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo genético

(Eguiarte *et al.*, 2007). Se basan principalmente en los modelos teóricos de estructura poblacional, el más usado es el de islas infinitas (infinite island model) (Figura 12). Este modelo supone migración entre un número infinito de islas o subpoblaciones de igual tamaño, que intercambian migrantes entre cualquiera de las islas con igual probabilidad a una tasa constante; donde hay ausencia de selección o mutación, y el flujo genético no es afectado por la distancia geográfica entre poblaciones y que cada población está en un equilibrio entre migración y deriva (Eguiarte *et al.*, 2007). Otro modelo, es el de aislamiento por distancia (mencionado en el Capítulo 3, Figura 12) que explora la relación del flujo genético entre pares de poblaciones (M), con la distancia geográfica (Slatkin, 1993) para determinar si existe una correlación significativa entre ambos. Para ello se utiliza comúnmente una prueba de correlación matricial de Mantel (mencionado en el capítulo 2), ya que los valores de M para los diferentes pares de poblaciones no son independientes. Ambos modelos (de islas y aislamiento por distancia) utilizan el índice de fijación F_{st} como medida de diferenciación, el cual “mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones” (Eguiarte *et al.*, 2007).

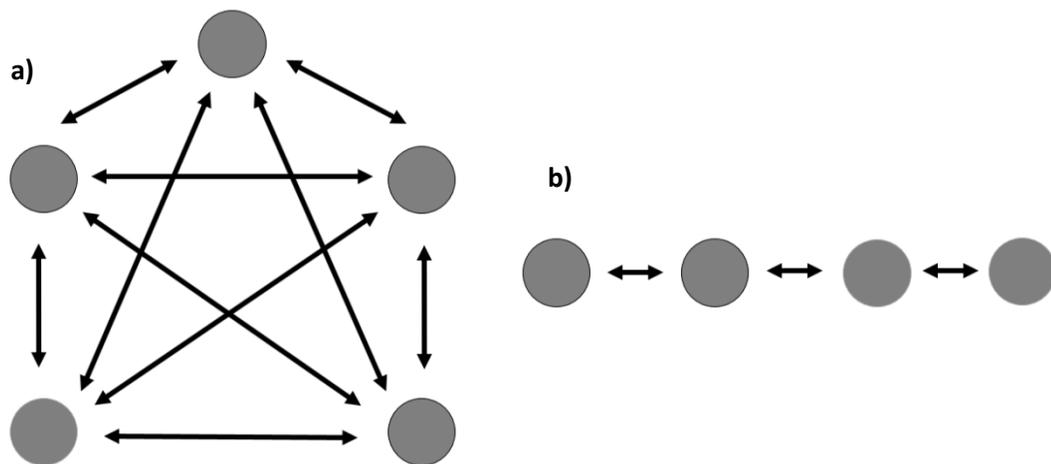


Figura 13. Modelos de flujo genético más usados. a) Estructura de isla donde el flujo genético es igual entre islas del mismo tamaño; b) Estructura de “stepping-stone” lineal donde las poblaciones más cercanas presentan mayor nivel de flujo genético. Modificado de Crooks y Sanjayan (2006).

El índice de *Fst* es un parámetro de gran utilidad para el estudio de las poblaciones y proporciona valiosa información sobre la importancia evolutiva del flujo y la deriva genética. A pesar de ello, algunos estudios señalan que en la práctica, sus estimaciones pueden ser limitadas en algunos casos (pocas órdenes de magnitud), debido principalmente a los supuestos del modelo de isla que no siempre se ajustan a las poblaciones estudiadas (Eguiarte *et al.*, 2007; Hedgecock *et al.*, 2007). Otros autores señalan que el uso de loci poco polimórficos o que estén sujetos a selección; o cuando los tamaños poblacionales son muy grandes y la deriva genética es muy débil puede conducir a subestimaciones o sobreestimaciones. Sin embargo, se ha comprobado que es posible tener una interpretación adecuada si se toman en cuenta dichas inconveniencias para estimar flujo genético (Bohonak, 1999; Eguiarte *et al.*, 2007; Grosberg y Cunningham, 2000).

Por otro lado, los patrones geográficos de diferenciación genética no pueden ser tomados como única evidencia de baja conectividad, ni la homogeneidad genética como alta conectividad. Se requiere de información complementaria para apoyar las inferencias sobre la conectividad de los datos genéticos espaciales. Es importante tomar en cuenta la variabilidad genética espacial y temporal y no se debe suponer que las poblaciones marinas están en equilibrio para los procesos demográficos y evolutivos.

Existen nuevos enfoques como la teoría de la coalescencia que han superado algunas desventajas en el uso del *Fst*. En estos métodos se usan secuencias de ADN que presentan alta variación molecular neutral, son útiles para reconstruir los procesos evolutivos con los principios de coalescencia y permiten estimar parámetros poblacionales como las tasas de mutación o migración (Rosenberg y Nordborg, 2002). Un método muy útil que estima simultáneamente los tamaños efectivos de muchas poblaciones, así como las tasas de migración entre cada par de poblaciones es el de Beerli (2012), implementado en el programa MIGRATE.

4.1.3. Escalas de medición de los métodos genéticos

Los enfoques directos e indirectos empleados para medir la conectividad generan información opuesta en terminos de escala temporal (Figura 13). Por un lado, los métodos directos miden la migración en tiempo ecológico, es decir, estiman intercambio demográfico contemporáneo, pero no son capaces de detectar eventos estocásticos (huracanes) o impactos ambientales recurrentes (ENSO, cambio de régimen a escala de décadas) sobre la conectividad. Son útiles cuando se quiere estudiar el flujo genético en una escala ecológica fina, mientras que los métodos genéticos indirectos que estiman los niveles de flujo genético con F_{st} reflejan flujo génico histórico, no el flujo genético que está ocurriendo en el presente, ya que estiman la conectividad sobre escalas de tiempo evolutivo (Eguiarte *et al.*, 2007; Hedgecock *et al.*, 2007).

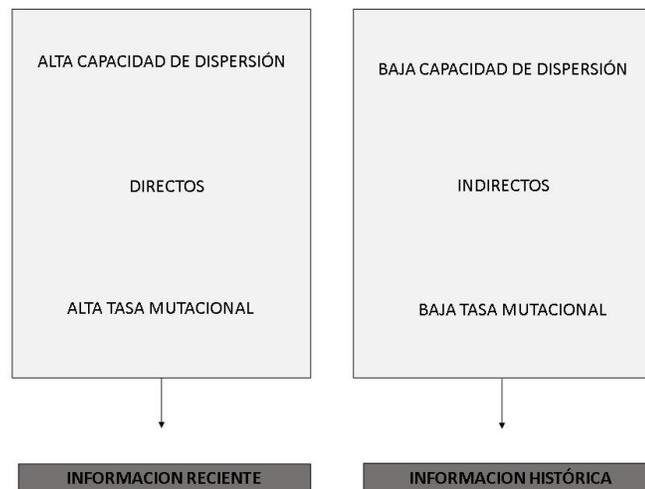


Figura 14. Resolución de la información a escala temporal. Características de historia de vida de las especies, métodos genéticos y variabilidad de los marcadores moleculares.

Es importante tener en cuenta que entre estas dos escalas de detección, se encuentra una amplia gama temporal intermedia de importancia biológica que puede afectar intensamente la dinámica de las poblaciones marinas y que son indetectables con los métodos actuales (Hedgecock *et al.*, 2007). También es importante reconocer que la estimación de la conectividad depende de la amplitud de la variación genética espacial,

por lo tanto, es un reto el desarrollo de métodos que detecten la conectividad en condiciones más complejas, de alto flujo de genes y/o situaciones de desequilibrio, común en muchas especies marinas explotadas (Hedgecock *et al.*, 2007).

4.2. Análisis comparativo de las especies analizadas en este trabajo

El objetivo central de esta tesis es evaluar la influencia de los procesos evolutivos, biológicos, ecológicos y oceanográficos en los patrones de diversidad y estructura genética, y los patrones de conectividad de dos especies arrecifales que contrastan en su historia de vida y capacidad de dispersión (*Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus*). Para ello se realizó un análisis comparativo de los patrones de conectividad y estructura genética, probándose la hipótesis de que los patrones de conectividad y estructura genética mostrados en la especie con menor capacidad de dispersión larval (*C. vermifera*), reflejará procesos históricos, mientras que la especie con mayor capacidad de dispersión (*S. flavilatus*) reflejará los patrones oceanográficos actuales.

En los capítulos anteriores se evidenció la diferencia en los patrones de conectividad y estructura genética poblacional encontrada en las dos especies analizadas. Esos resultados no rechazaron la hipótesis de este trabajo, al encontrar alta congruencia en el grado de conectividad con la historia de vida de cada especie (Tabla 16). Por un lado las poblaciones de *C. vermifera* estuvieron altamente estructuradas a escalas de cientos a miles de km, y reflejaron un modelo de dispersión de aislamiento por distancia consistente con la historia de vida larval de las esponjas (corto periodo y comportamiento filopátrico). Mientras que las poblaciones de *S. flavilatus* mostraron fuerte conectividad en todas las escalas espaciales estudiadas, y los valores de las tasas de migración fueron muy altos, lo cual es consistente con la alta capacidad de dispersión de la especie en su periodo larvario.

Tabla 16. Tabla comparativa de los resultados generales de *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus*.

	<i>C. vermifera</i>		<i>S. flavilatus</i>	
	ADNmt	ADNn	ADNmt	ADNn
Φ_{st}	Alto significativo	Bajo significativo	No significativo	Bajo y significativos
Φ_{st} pareado	Significativo a distancias mayores de 500 km y mayores de 1000 km; No significativo a distancias de 10 de km	Significativo en todas las escalas espaciales	No significativo	No significativos
Patrón de estructura poblacional y conectividad	Estructura de Stepping-stone lineal	Estructura de "Stepping-stone" lineal	Estructura de metapoblación	Estructura de metapoblación

Los patrones específicos encontrados en *C. vermifera* sugieren la existencia de una señal histórica al no detectarse un patrón de conectividad relacionado con las características oceanográficas actuales. De ser así, el bajo nivel de flujo genético estaría permitiendo que la señal de separación histórica persista por muchas generaciones (Pelc *et al.*, 2009).

En el caso de *S. flavilatus*, el valor tan bajo de diferenciación encontrado en el marcador mitocondrial $F_{st} \approx 0$, sugiere que existen altos niveles de conectividad matrilineal entre las localidades estudiadas. Sin embargo, cuando se utilizan genes de ADNmt, se tiene cierta reserva en los resultados, dependiendo de los tamaños efectivos de las poblaciones, ya que la tasa de divergencia podría ser lenta, por lo tanto, la falta de varianza de las frecuencias haplotípicas estarían reflejando insuficiente tiempo desde una separación para alcanzar el equilibrio entre deriva-migración (Hedgecock *et al.*, 2007).

No obstante, con los loci microsatelitales se confirmó la alta conectividad de las poblaciones de *S. flavilatus* ($F_{st} = 0.0073$, $p = 0.2329$; $R_{st} = 0.0287$, $p = 0.1431$), aunado a ello fue posible detectar un flujo genético muy alto y asimétrico (Tabla 14), que

podría estar reflejando un patrón general más reciente de estructura asociado con las características oceanográficas del PM (Figura 14).

En conclusión, el análisis comparativo de los patrones de conectividad genética de *C. vermifera* y *S. flavilatus* reflejó la influencia de fuerzas ecológicas recientes en la especie con larvas planctónicas, predominantemente con los marcadores más polimórficos. Así mismo se detectó la señal de tiempo evolutivo en la especie con larva lecitotrófica con menor potencial de dispersión junto con los marcadores que presentan tasas mutacionales más lentas. Sin embargo, es posible que las limitaciones del enfoque genético empleado en este estudio no hayan permitido detectar los patrones a escalas intermedias más específicas, por lo cual se reconoce la importancia de la implementación de un enfoque multidisciplinario que supere dichos retos.

4.3. Conectividad y estructura genética en especies arrecifales del Pacífico mexicano

En las últimas décadas, se han realizado diversos estudios de conectividad y estructura genética en especies de diferentes grupos taxónomicos asociados a comunidades arrecifales en el PM, que presentan historias de vida contrastantes y son abundantes en esta región. En esta sección analizaremos los patrones prevalecientes que se han detectado en cada estudio basados en métodos genéticos indirectos con diferentes marcadores moleculares.

En el trabajo de Paz-García *et al.* (2012), se estimaron los patrones de conectividad genética en las poblaciones del coral *Pocillopora damicornis* y *Porites panamensis* a lo largo del PM. Estas especies presentan características morfológicas y estrategias reproductivas contrastantes. La primera especie es de estructura ramificada con reproducción asexual y sexual (fertilización externa) y la segunda es de morfología masiva y se reproduce sexualmente (fertilización interna) (Chávez-Romo, 2004). En su estudio realizaron un análisis con un enfoque de genética del paisaje empleando 5 aloenzimas polimórficas como marcadores genéticos, y en ambas especies se detectó diferenciación genética, agrupándose localidades en tres regiones, las localidades

correspondientes al Golfo de California, la segunda correspondiente a las localidades de la entrada del GC y la tercera las localidades del sur pertenecientes al estado de OAX. Así mismo se encontró una fuerte discontinuidad genética, formándose un solo grupo en las localidades de OAX (Dos Hermanas y La Entrega) evidenciando una barrera importante para el flujo genético entre las poblaciones de OAX y la localidad más norteña (Bahía de Banderas), ésta barrera corresponde a un importante tramo de litoral de playas de arena y lagunas. En las localidades del Sur de Baja California y el resto de la costa de México se encontró bajo nivel de flujo que fue relacionado con alto reclutamiento local y discontinuidad del hábitat. En este estudio se encontraron patrones similares con ambas especies, sugiriendo que las corrientes superficiales y la discontinuidad del hábitat son factores más importantes en la conectividad de especies coralinas, que sus estrategias reproductivas.

Así mismo, se han analizado las poblaciones de otras especies distribuidas en las comunidades arrecifales a lo largo del PM, la familia Agaricidae (*Pavona gigantea*), Poritidae (*Porites panamensis*) y Pocilloporidae (*Pocillopora verrucosa*), (Saavedra-Sotelo *et al.*, 2011; Saavedra-Sotelo, 2013; Saavedra-Sotelo *et al.*, 2013).

En las poblaciones de *P. gigantea* estimaron el nivel de conectividad en sus poblaciones. Aunque se tiene un conocimiento limitado sobre las estrategias reproductivas de esta especie, se ha encontrado que presenta fertilización externa en algunas regiones del Pacífico oriental (Glynn *et al.*, 1996; Steiner y Cortés, 1996). Para este estudio emplearon dos genes mitocondriales (COX1 y NAD3-5) y uno nuclear (ADNr). Con el marcador nuclear de mayor variabilidad encontraron que las poblaciones de *P. gigantea* representan poblaciones genéticamente distintas en el PM. Sin embargo, las distancias genéticas no se relacionaron con las distancias geográficas.

Por otra parte, encontraron una conectividad demográfica limitada a lo largo del Pacífico mexicano, mediada por el transporte pasivo de larvas, y un flujo unidireccional de genes de Bahías de Huatulco a Bahía de la Paz y a las Islas Marietas. Este patrón de conectividad concuerda con el patrón general de la circulación superficial oceanográfica de la región, y en particular con el flujo hacia el norte de la COM. Además sus resultados fueron asociados a eventos de dispersión ocasional a grandes distancias.

Finalmente, concluyeron que sus resultados podrían estar reflejando eventos históricos y no únicamente flujo genético contemporáneo.

En las poblaciones de *P. panamensis* evaluaron su estructura poblacional empleando un enfoque de paisaje genético. Esta especie presenta una estrategia reproductiva que involucra una larva planula lecitotrófica de corta duración con fertilización interna y se asienta cerca de la colonia parental por lo que tiene una dispersión potencial limitada. Su estudio consistió en probar si los niveles de diversidad y conectividad son altos entre poblaciones más abundantes que entre poblaciones más escasas. Para ello utilizaron 2 marcadores genéticos nucleares (ADNr y ORF y 5 loci aloenzimáticos). Dentro de sus resultados se detectaron niveles de diversidad más altos en las poblaciones peninsulares (BC), y diferenciación significativa entre la península y las colonias continentales. Así mismo, las poblaciones continentales mostraron mayores niveles de diferenciación y conectividad más baja que las poblaciones peninsulares, y no se encontró relación de las distancias genéticas con las distancias geográficas en cada región.

Con el uso de datos ambientales y con el modelado de nicho, pudieron identificar que los factores ambientales (temperatura, turbidez y disponibilidad del sustrato) se correlacionaron con los patrones de abundancia, diversidad genética y estructura. En cuanto a las tasas de migración, encontraron alto flujo de las localidades de OAX hacia las localidades de la península de BC. Los resultados generales encontrados en su estudio fueron relacionados con el tipo de reproducción de la especie, ya que el pico reproductivo en la región continental sólo se da en una temporada del año (verano).

La especie más dominante de la región, *P. verrucosa*, fue estudiada para probar si la estrategia reproductiva (sexual y asexual) de la especie influyen en la diversidad genética y su estructura poblacional. Esta especie presenta una estrategia reproductiva predominantemente sexual (fertilización externa) pero en algunas regiones se ha documentado reproducción asexual por fragmentación (Aranceta-Garza *et al.*, 2012). Utilizando marcadores microsatelitales detectaron diferenciación genética somera y significativa a nivel de toda la región de estudio. Encontraron mayor número de colonias clonales en el PM que en la península de BC. En los análisis bayesianos de estructura detectaron cuatro grupos genéticos considerados como poblaciones que presentaron

diferencias significativas entre ellas. Las poblaciones que se formaron coincidieron con características ambientales contrastantes. Así mismo encontraron una predominancia de genotipos asociados a todas las localidades del PM con excepción de OAX, mientras que otros genotipos solo estuvieron asociados predominantemente a la población de OAX, siendo esta una de las localidades que aportó la mayor diferenciación en los análisis de *F_{st}*. Finalmente, en este estudio no encontraron correlación entre la distancia genética con la distancia geográfica y ambiental. Sin embargo, las poblaciones que presentaron diferencias genéticas estuvieron asociadas a factores biológicos y ambientales contrastantes.

El patrón de estructura y alto flujo genético encontrados en las poblaciones de *P. verrucosa* permitieron determinar que su estructura poblacional refleja una dinámica similar a la de una metapoblación, debido a que la mayoría de las estimaciones revelaron que el flujo genético es principalmente del norte al sur, siendo el GC una población que funciona como “fuente” de propágulos hacia las localidades sureñas. Por el contrario, el flujo de genes en dirección contraria fue escasa y casi nula. Aunado a esto, la localidad que no aportó genes a ninguna localidad fue OAX (BH), por el contrario recibió valores altos de la mayoría de las localidades comportándose como una población “sumidero” y debido a que la localidad de OAX fue una de las localidades con presencia de organismos clonales, lo cual nos indica que es una población con menor probabilidad de ser fuente.

Recientemente se realizaron dos trabajos con peces asociados a las comunidades arrecifales de la familia Labridae (*Thalassoma lucasanum*) (Dominguez-Rivera 2011) y Pomacentridae (*Stegastes acapulcoensis*) de fertilización externa (Chassin-Noria y Urbiola-Rangel, 2013).

Thalassoma lucasanum es una de las especies más abundantes y representativas de las comunidades de peces arrecifales del PM, y sus poblaciones fueron estudiadas para medir el nivel de variabilidad genética y estructura poblacional con un marcador de la región control del ADNm. En general, se encontró una baja variabilidad con este marcador mitocondrial, sus resultados fueron asociados con la demografía histórica, el sistema de apareamiento poligámico y las condiciones del hábitat, como factores que

han contribuido al mantenimiento de una baja variabilidad genética mitocondrial en la especie.

En el estudio de las poblaciones de *S. acapulcoensis* analizaron cuatro poblaciones del Sur del Pacífico mexicano, separadas por una distancia geográfica máxima de 435 km. El análisis se realizó con cuatro loci microsatelitales. En general se encontraron niveles bajos de diferenciación y alta conectividad entre las cuatro localidades que estudiaron. Sus resultados fueron asociados a la capacidad de dispersión de *S. acapulcoensis* en su etapa de larva pelágica considerando que sus larvas son pelágicas durante 19 a 23 días, (Wellington y Victor, 1989), por lo cual tendrían la posibilidad de seguir los cambios estacionales de dirección de la Corriente del Oeste de México (COM) (Figura 14).

En general, los resultados de los estudios en cada especie estuvieron asociados principalmente a las características de su historia de vida. Sin embargo, en los corales se observó que tanto las condiciones ambientales como la discontinuidad del hábitat a lo largo de la región del PM son factores que están influyendo en gran medida en la estructuración de sus poblaciones. Además, el patrón de flujo genético parece estar mediado por las estrategias reproductivas y por las principales corrientes superficiales del PM (COM; CCCR) (Figura 14).

Con respecto a los peces arrecifales, tanto en los dos trabajos mencionados anteriormente como en el presente estudio se ha evidenciado que la estructura genética está determinada principalmente por la capacidad de dispersión; que les permite una rápida colonización y en algunos casos también pueden seguir los cambios estacionales de dirección de las corrientes.

Por otra parte, en la esponja perforadora evaluada en este estudio, fue evidente que su estructura genética está fuertemente determinada por su periodo larval y su limitada o nula capacidad de dispersión. En ese sentido la composición genética de sus poblaciones es mejor explicada por procesos históricos que contemporáneos.

Finalmente, en estos estudios se ha encontrado que las localidades de la costa sur del PM (Oaxaca) se encuentran en una región que presenta condiciones ambientales muy particulares, que pueden estar influyendo fuertemente en el patrón de flujo y la

difereciación genética de las poblaciones presentes en esta región. Una característica particular de esta zona es la presencia de vientos invernales denominados Tehuanos, que ocasionan desequilibrios en la termoclina haciendo que se generen surgencias y episodios de disminución de la temperatura (Pennington et al. 2006). Otros estudios han sugerido que las especies de esta localidad se encuentran estrechamente relacionadas con las regiones de Centro América (Glynn y Ault, 2000), y que la CCCR permite el transporte de propágulos a las localidades del sur del PM, y el giro de Tehuantepec puede representar una barrera para el flujo de genes hacia las localidades más norteñas del PM (Figura 14). Con base en lo anterior, es importante realizar estudios de estructura genética poblacional que incluyan más localidades sureñas del PM y de Centroamérica, para detectar el nivel de flujo genético entre esas regiones.

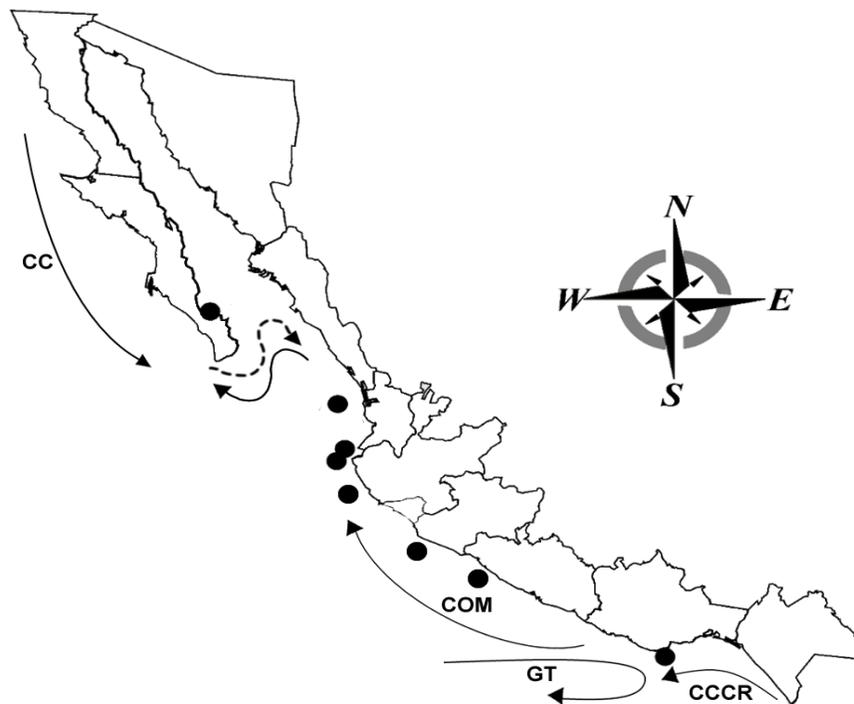


Figura 15. Corrientes superficiales de la costa occidental de México. Las flechas representan los patrones generales de circulación superficial. CC: Corriente de California; COM: Corriente Occidental de México; GT: Giro de Tehuantepec y CCCR: Corriente costera de Costa Rica. La flecha sólida en la entrada del golfo de California indica la circulación oceánica en verano; la flecha punteada representa el cambio de circulación oceánica en invierno. Los puntos representan las localidades de estudio de *Cliona vermifera* y *Stegastes flavilatus*, ya descritas en los capítulos anteriores. Modificado de Paz-García et al. (2012).

No obstante el patrón general observado en los peces arrecifales muestran que existen un flujo intenso de genes de OAX hacia las localidades más norteñas, es decir, que tiene una aportación importante de larvas hacia otros sitios, mientras que el flujo de otras localidades hacia el sur fue más bajo. Este patrón parece ser influenciado por la dirección de flujo de la COM (Figura 14).

Estos estudios ponen de manifiesto la complejidad de los patrones de conectividad en base a la alta variabilidad de las características oceanográficas del PM, aunado a las características de historia de vida de los organismos arrecifales como son las estrategias reproductivas.

4.4. Enfoque multidisciplinario para detectar patrones de conectividad

La complejidad de los patrones de conectividad en las poblaciones marinas y la amplitud de factores que intervienen, ha conducido a la integración de un enfoque multidisciplinario, con el fin de ayudar a explicar dichos patrones en diferentes escalas espaciales y temporales (Levin, 2006). En el cual las herramientas moleculares han aportado información clave sobre los procesos evolutivos y ecológicos que están involucrados. Por ejemplo, las estimaciones realizadas a través de datos genéticos pueden ser consistentes con los datos generados de modelos biofísicos de corrientes oceanográficas que permiten predecir la distribución espacial y temporal de las larvas, así como la dirección y frecuencia de su dispersión. Este enfoque es muy útil para clarificar el patrón de conectividad en poblaciones que presentan una débil pero consistente diferenciación genética, así como para detectar estructura metapoblacional de diferentes especies marinas cuando la dinámica de sus poblaciones es muy compleja (Baums *et al.*, 2006; Fauvelot *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2012; Munguia-Vega *et al.*, 2014; Paz-García *et al.*, 2012).

Debido a la amplitud de disciplinas que pueden intervenir (oceanografía física, ecología larval, modelación y genética, entre otros) y a la información que se genera en un análisis multidisciplinario, este enfoque resulta prioritario para el entendimiento de la conectividad de poblaciones marinas y consecuentemente para el manejo y diseño de

áreas marinas protegidas, siendo los métodos genéticos y el análisis de cohortes los que desempeñan un rol importante (Hedgecock *et al.*, 2007).

Referencias bibliográficas

- Addison, J. A. and Hart, M. W. (2005). Spawning, Copulation and Inbreeding Coefficients in Marine Invertebrates. *Biology letters*, 1 (4), 450–453.
- Aljanabi, S. M., and Martinez, I. (1997). Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. *Nucleic acids research*, 25 (22), 4692–4693.
- Allen, G. (2006). Recuperado en febrero de 2015 de: http://stri.discoverlife.org/mp/20q?search=Stegastes+flavilatus&l=spanish_
- Aranceta-Garza, F., Balart, E. F., Reyes-Bonilla, H., and Cruz-Hernández, P. (2012). Effect of Tropical Storms on Sexual and Asexual Reproduction in Coral *Pocillopora Verrucosa* Subpopulations in the Gulf of California. *Coral Reefs*, 31, 1157-1167.
- Armsworth, P. R. (2002). Recruitment Limitation, Population Regulation, and Larval Connectivity in Reef Fish Metapopulations. *Ecology*, 83 (4), 1092–1104.
- Barucca, Marco, Azzini, Francesca, Bavestrello, Giorgio, Biscotti, Maria, Calcinai, Barbara, Canapa, Adriana, Cerrano, Carlo, and Olmo, Ettore. (2007). The Systematic Position of Some Boring Sponges (Demospongiae, Hadromerida) Studied by Molecular Analysis. *Marine Biology*, 151 (2), 529–535.
- Battershill, C. N., and Bergquist, P. R. (1990). The Influence of Storms on Asexual Reproduction, Recruitment, and Survivorship of Sponges. In: K. Rützler (Ed.). *New Perspectives in Sponge Biology*. (pp. 397–403) Washington D.C.: Smithsonian Institution.
- Baums, Iliana B., Paris, Claire B., and Chérubin, Laurent M. (2006). A Bio-Oceanographic Filter to Larval Dispersal in a Reef-Building Coral. *Limnology and Oceanography*, 51 (5), 1969–1981.
- Bautista-Guerrero, E. (2006). New Coral Reef Boring Sponges (Hadromerida: Clionidae) from the Mexican Pacific Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 86, 963–970.
- Bautista-Guerrero, Eric, Carballo, Jose Luis, and Maldonado, Manuel. (2010). Reproductive Cycle of the Coral-Excavating Sponge *Thoosa Mismalolli* (Clionidae) from Mexican Pacific Coral Reefs. *Invertebrate Biology*, 129 (4), 285–296.
- Bautista-Guerrero, Eric, Carballo, José Luis, and Maldonado, Manuel. (2014). Abundance and Reproductive Patterns of the Excavating Sponge *Cliona Vermifera*: A Threat to Pacific Coral Reefs?, *Coral Reefs*, 33 (1), 259–266.
- Bay, Line K, M Julian M Caley, and Ross H Crozier. 2008. Meta-Population Structure in a Coral Reef Fish Demonstrated by Genetic Data on Patterns of Migration, Extinction and Re-Colonisation, *BMC evolutionary biology*, 8, 248.

- Becking, Leontine E., Erpenbeck, Dirk, Peijnenburg, Katja T. C. A., and de Voogd, Nicole J. (2013). Phylogeography of the Sponge *Suberites Diversicolor* in Indonesia: Insights into the Evolution of Marine Lake Populations. *PloS one*, 8 (10), e75996.
- Beerli, Peter. (2012). Migrate. *Genetics*.
- Bentlage, B., and Wörheide, G. (2007). Low Genetic Structuring among *Pericharax Heteroraphis* (Porifera: Calcarea) Populations from the Great Barrier Reef (Australia), Revealed by Analysis of nrDNA and Nuclear Intron Sequences. *Coral Reefs*, 26 (4), 807–816.
- Benzie, J. A. H., Sandusky, C., and Wilkinson, C. R., (1994). Genetic Structure of Dictyoceratid Sponge Populations on the Western Coral Sea Reefs. *Marine Biology*, 119 (3), 335–345.
- Bernardi, Giacomo., Holbrook, J., Schmitt, Russell J. (2001). Gene Flow at Three Spatial Scales in a Coral Reef Fish, the Three-Spot Dascyllus, *Dascyllus Trimaculatus*. *Journal of Molecular Evolution*, 138, 457–465.
- Blanquer, A., Uriz, M. J., and Caujapé-Castells, J. (2009). Small-Scale Spatial Genetic Structure in *Scopalina Lophyropoda*, an Encrusting Sponge with Philopatric Larval Dispersal and Frequent Fission and Fusion Events. *Marine Ecology Progress Series*, 380, 95–102.
- Blanquer, Andrea, and Uriz, Maria. (2010). Population Genetics at Three Spatial Scales of a Rare Sponge Living in Fragmented Habitats. *BMC evolutionary biology*, 10, 13.
- Bohonak, A. J. (2002). IBD (Isolation by Distance): A Program for Analyses of Isolation by Distance. *Journal of Heredity*, 93, 153–154.
- Bohonak, Andrew J. (1999). Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74 (1), 21–45.
- Bowen, B. W., Bass, A. L., Muss, A., Carlin, J., Robertson, D. R. (2006). Phylogeography of Two Atlantic Squirrelfishes (family Holocentridae): Exploring Links between Pelagic Larval Duration and Population Connectivity. *Marine Biology*, 149 (4), 899–913.
- Bradbury, Ian, Laurel, Benjamin, Snelgrove, Paul, Bentzen, Paul, Campana, Steven. (2008). Global Patterns in Marine Dispersal Estimates: The Influence of Geography, Taxonomic Category and Life History. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 275 (1644), 1803–1809.
- Carballo, José, Bautista, Eric, Nava, Héctor, Cruz-Barraza, José, Chávez, Jesús. (2013b). Boring Sponges, an Increasing Threat for Coral Reefs Affected by Bleaching Events. *Ecology and evolution*, 3 (4), 872–886.

- Carballo, J. L., Aguilar-Camacho, J. M., Knapp, I. S., and Bell, J. J. (2013a). Wide Distributional Range of Marine Sponges along the Pacific Ocean. *Marine Biology Research*, 9 (8) 768–775.
- Carballo, J. L., Bautista-Guerrero, E., and Leyte-Morales G. E. (2008a). Boring Sponges and the Modeling of Coral Reefs in the East Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 356. 113–122.
- Carballo, J. L., and Cruz-Barraza, J. A. (2005). *Cliona Microstrongylata*, a New Species of Boring Sponge from the Sea of Cortés (Pacific Ocean, México). *Cahiers de biologie marine*, 46, 379–387.
- Carballo, J. L., Cruz-Barraza J. A., Nava, H., and Bautista-Guerrero, E. (2008b). *Esponjas Perforadoras de Sustratos Calcáreos: Importancia en los ecosistemas arrecifales del Pacífico este*. (pp. 189). México. CONABIO.
- Carballo, J. L., Cruz-Barraza, J. A., and Gómez, P. (2004). Taxonomy and description of Clionaid Sponges (Hadromerida, Clionidae) from the Pacific Ocean of Mexico. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141, 353–397.
- Carballo, José Luis, Hepburn, Leanne, Nava, Héctor, Cruz-Barraza, José Antonio and Bautista-Guerrero, Eric. (2007). Coral Boring *Aka*-Species (Porifera: Phloeodictyidae) from Mexico with description of *Aka Cryptica* Sp. Nov. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87 (06), 1477–1484.
- Chapuis, Marie Pierre, and Estoup, Arnaud. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (3), 621–631.
- Chávez-Comparan, Juan, Galeana-Lemus, Gemma, Manzo-Vargas, Ismael, Salinas-Sánchez, Jorge. (2008). *Catálogo de Peces de Arrecifes Rocosos-Coralinos de Punta Carrizales, Colima, México*. (pp. 118). México. CONABIO. Recuperado en noviembre de 2014 de: http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/DJ020_Catalogo_3ra%20Parte.pdf.
- Chávez-Romo, Héctor E. (2004). Biología Reproductiva de *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) (Scleractinia) en Puntas Gaviotas, bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 79p.
- Chen, Chaolun Allen, Ablan, Maria Carmen Anonuevo, McManus, John Williams, Bell, Johann Diepernk, Tuan, Vo Si, Cabanban, Annadel Sarmiento, Shao, Kwang-Tsao. (2004). Population Structure and Genetic Variability of Six Bar Wrasse (*Thalassoma Hardwicki*) in Northern South China Sea Revealed by Mitochondrial Control Region Sequences. *Marine biotechnology*, 6 (4), 312–326.

- Christie, M., Johnson, D., Stallings, C., Hixon, M. (2010). Self-recruitment and sweepstakes reproduction amid extensive gene flow in a coral-reef fish. *Molecular Ecology*, 19, 1042–1057.
- Clarke, K. R., and Gorley, R. N. (2006). *PRIMER v6: User Manual/Tutorial PRIMER-E*. Plymouth.
- Clement, M., Posada, D., and Crandall, K. A. (2000). TCS: A Computer Program to Estimate Gene Genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10), 1657–1659.
- Cowen, R. K., Paris, C. B., Olson, D. B., Fortuna, J. L. (2000). Connectivity of Marine Populations: Open or Closed? *Science*, 287 (5454), 857–859.
- Cowen, R K, C B Paris, D B Olson, and J L Fortuna. 2002. The Role of Long Distance Dispersal in Replenishing Marine Populations. *Gulf and Caribbean Research*, 14(2): 129–137.
- Cowen, R. K., and Sponaugle, Su. (2009). Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annual review of marine science*, 1, 443–466.
- Cowen, R. K., Paris, C. B., and Srinivasan, A. (2006). Scaling of Connectivity in Marine Populations. *Science*, 311 (5760), 522–527.
- Cowen, Robert, Gawarkiewicz, Glen, Pineda, Jesus, Thorrold, Simon, Werner, Francisco. (2007). Population Connectivity in Marine Systems. *Oceanography*, 20 (3), 14–21.
- Crabbe, James. (2008). Climate Change, Global Warming and Coral Reefs: Modelling the Effects of Temperature. *Computational biology and chemistry*, 32 (5), 311–314.
- Crooks, K., and Sanjayan, M. (2006). *Connectivity Conservation*. (pp. 712). United States of America, New York, Cambridge University Press.
- Cruz-Barraza, José Antonio, Carballo, José Luis, Bautista-Guerrero, Eric, and Nava, Héctor. (2011). New Species of Excavating Sponges (Porifera: Demospongiae) on Coral Reefs from the Mexican Pacific Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91 (05), 999–1013.
- Dailianis, T., Tsigenopoulos, C. S., Dounas, C., and Voultsiadou, E. (2011). Genetic Diversity of the Imperilled Bath Sponge *Spongia Officinalis* Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: Patterns of Population Differentiation and Implications for Taxonomy and Conservation. *Molecular ecology*, 20 (18), 3757–3772.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D., (2012). jModelTest 2: More Models, New Heuristics and Parallel Computing. *Nature Methods*, 9 (8), 772.
- DeBiasse, M. B., Richards, V. P., and Shivji, M. S. (2010). Genetic Assessment of Connectivity in the Common Reef Sponge, *Callyspongia Vaginalis* (Demospongiae:

- Haplosclerida) Reveals High Population Structure along the Florida Reef Tract. *Coral Reefs*, 29 (1), 47–55.
- Doherty, Peter, Planes, Serge, and Mather, Peter. (1995). Gene Flow and Larval Duration in Seven Species of Fish from the Great Barrier Reef. *Ecology*, 76 (8), 2373–2391.
- Domingues, Vera S., Alexandrou, Markos, Almada, Vitor C., Robertson, D. Ross, Brito, Alberto, Santos, Ricardo S., Bernardi, Giacomo. (2008). Tropical Fishes in a Temperate Sea: Evolution of the Wrasse *Thalassoma Pavo* and the Parrotfish *Sparisoma Cretense* in the Mediterranean and the Adjacent Macaronesian and Cape Verde Archipelagos. *Marine Biology*, 154 (3), 465–474.
- Dominguez-Rivera, Patricia A. (2011). Variabilidad Genética de La Región Control Mitocondrial Del Pez Arrecifal (*Thalassoma Lucasanum*) En El Pacifico Tropical Mexicano. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 66 p.
- Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., and Turon, X. (2004c). Strong Population Structure in the Marine Sponge *Crambe Crambe* (Poecilosclerida) as Revealed by Microsatellite Markers. *Molecular Ecology*, 13 (3), 511–522.
- Duran, S., Giribet, G., and Turon, X. (2004a). Phylogeographical History of the Sponge *Crambe Crambe* (Porifera, Poecilosclerida): Range Expansion and Recent Invasion of the Macaronesian Islands from the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 13 (1), 109–122.
- Duran, S., Pascual, M., and Turon, X. (2004b). Low Levels of Genetic Variation in mtDNA Sequences over the Western Mediterranean and Atlantic Range of the Sponge *Crambe Crambe* (Poecilosclerida). *Marine Biology*, 144 (1), 31–35.
- Duran, Sandra, and Rützler, Klaus. (2006). Ecological Speciation in a Caribbean Marine Sponge. *Molecular phylogenetics and evolution*, 40 (1), 292–297.
- Earl, Dent A., and VonHoldt, Bridgett M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2), 359–361.
- Eguiarte, Luis E., Souza, Valeria, and Aguirre, Xitlali. (2007). *Ecología Molecular*. México, D.F. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Escobar, Dairo, Zea, Sven, and Sánchez, Juan. (2012). Phylogenetic Relationships among the Caribbean Members of the *Cliona Viridis Complex* (Porifera, Demospongiae, Hadromerida) Using Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 64 (2), 271–284.

- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software STRUCTURE: A Simulation Study. *Molecular Ecology*, 14 (8), 2611–2620.
- Excoffier, Laurent, Laval, Guillaume, and Schneider, Stefan. (2005). Arlequin (version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47–50.
- Fauvelot, C., Bernardi, G., and Planes, S. (2003). Reductions in the Mitochondrial DNA Diversity of Coral Reef Fish Provide Evidence of Population Bottlenecks Resulting from Holocene Sea-Level Change. *Evolution; international journal of organic evolution*, 57 (7), 1571–1583.
- Fauvelot, C., and Planes, S. (2002). Understanding Origins of Present-Day Genetic Structure in Marine Fish: Biologically or Historically Driven Patterns?. *Marine Biology*, 141 (4), 773–788.
- Figueira, Will F. (2009). Connectivity or Demography: Defining Sources and Sinks in Coral Reef Fish Metapopulations. *Ecological Modelling*, 220 (8), 1126–1137.
- Fogarty, Michael J., and Botsford, Louis W. (2007). Population Connectivity and Spatial Management of Marine Fisheries. *Oceanography*, 20 (3), 112–123.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3 (5) 294–299.
- Foster, Nicola L., Paris, Claire B., Kool, Johnathan T., Baums, Iliana B., Stevens, Jamie R., Sanchez, Juan A., Bastidas, Carolina, Agudelo, Claudia, Bush, Phillippe, Day, Owen, Ferrari, Renata, Gonzalez, Patricia, Gore, Shannon, Guppy, Reia, McCartney, Michael A., McCoy, Croy, Mendes, Judith, Srinivasan, Ashwanth, Steiner, Sascha, Vermeij, Mark J., Weil, Ernesto, Mumby, Peter J. (2012). Connectivity of Caribbean Coral Populations: Complementary Insights from Empirical and Modelled Gene Flow. *Molecular Ecology*, 21 (5), 1143–1157.
- Gaggiotti, Oscar E., and Russel D. Vetter. (1999). Effect of Life History Strategy, Environmental Variability, and Overexploitation on the Genetic Diversity of Pelagic Fish Populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56 (8), 1376–1388.
- Gaines, Steven D., Gaylord, Brian, Gerber, Leah R., Hastings, Alan, Kinlan, Brian. (2007). Connecting Places. The Ecological Consequences of Dispersal in the Sea. *Oceanography*, 20 (3), 90–99.
- Galindo, Heather M., Pfeiffer-Herbert, Anna S., McManus, Margaret, Chao, Yi, Chai, Fei, Palumbi, Stephen R. (2010). Seascape Genetics along a Steep Cline: Using

- Genetic Patterns to Test Predictions of Marine Larval Dispersal. *Molecular ecology*, 19 (17), 3692–3707.
- Galindo, Heather M., Olson, Donald B., and Palumbi, Stephen R. (2006). Seascape Genetics: A Coupled Oceanographic-Genetic Model Predicts Population Structure of Caribbean Corals. *Current Biology*, 16 (16), 1622–1626.
- Gillanders, Bronwyn M. (2002). Connectivity between Juvenile and Adult Fish Populations: Do Adults Remain near Their Recruitment Estuaries? *Marine Ecology Progress Series*, 240, 215–223.
- Glynn, P. W., Veron, J. E. N., and Wellington, G. M. (1996). Coral Reefs Clipperton Atoll (Eastern Pacific): Oceanography, Geomorphology, Reef-Building Coral Ecology and Biogeography. *Coral Reefs*, 15, 71–99.
- Glynn, P. W., and Ault, J. S. (2000). A Biogeographic Analysis and Review of the Far Eastern Pacific Coral Reef Region. *Coral Reefs*, 19 (1), 1–23.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86 (6), 485–486.
- Grantham, Brian A., Eckert, Ginny L., and Shanks, Alan L. (2003). Dispersal Potential of Marine Invertebrates in Diverse Habitats. *Ecological Applications*, 13(1 SUPPL.), 108–116.
- Grosberg, Rick, and Cunningham, C. W. (2000). Genetic Structure in the Sea: From Populations to Communities. In M. D. Bertness, S. D. Gaines, and M. Hay. (Eds.). *Marine Community Ecology*. (pp. 61–84). Sunderland, MA.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast and Accurate Method to Estimate Large Phylogenies by Maximum-Likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.
- Guo, Sun Wei, and Thompson, Elizabeth A. (1992). Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics*, 48 (2), 361–372.
- Haney, R. A., Silliman, B. R., and Rand, D. M., (2007). A Multi-Locus Assessment of Connectivity and Historical Demography in the Bluehead Wrasse (*Thalassoma bifasciatum*). *Heredity*, 98 (5), 294–302.
- Hansen, Martin Christian, Tolker-Nielsen, Tim, Givskov, Michael, and Molin, Søren. (1998). Biased 16S rDNA PCR Amplification Caused by Interference from DNA Flanking the Template Region. *FEMS Microbiology Ecology*, 26 (2), 141–149.
- Hedgecock, Dennis, Barber, Paul, and Edmands, Suzanne. (2007). Genetic Approaches to Measuring Connectivity. *Oceanography*, 20 (3), 70–79.

- Hellberg, Michael E., Burton, Ronald S., Neigel, Joseph E., and Palumbi, Stephen R. (2002). Genetic Assessment of Connectivity among Marine Populations. *Bulletin of Marine Science*, 70 (1), 273–390.
- Hepburn, R. I., Sale, P. F., Dixon, B., and Heath, Daniel D. (2009). Genetic Structure of Juvenile Cohorts of Bicolor Damselfish (*Stegastes Partitus*) along the Mesoamerican Barrier Reef: Chaos through Time. *Coral Reefs*, 28 (1), 277–288.
- Herzka, Sharon Z. (2005). Assessing Connectivity of Estuarine Fishes Based on Stable Isotope Ratio Analysis. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 64 (1 SPEC. ISS.), 58–69.
- Hogan, J. D., Thiessen, R. J., and Heath, D. D. (2010). Variability in Connectivity Indicated by Chaotic Genetic Patchiness within and among Populations of a Marine Fish. *Marine Ecology Progress Series*, 417, 263–275.
- Hogan, J. Derek, Thiessen, Roger J., Sale, Peter F., and Heath, Daniel D. (2012). Local Retention, Dispersal and Fluctuating Connectivity among Populations of a Coral Reef Fish. *Oecologia*, 168 (1), 61–71.
- James, Maurice K, Armsworth, Paul R., Mason, Luciano B., and Bode, Lance. (2002). The Structure of Reef Fish Metapopulations: Modelling Larval Dispersal and Retention Patterns. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269 (1505), 2079–2086.
- Jensen, J. L., Bohonak, A. J., and Kelley, S. T., (2005). Isolation by Distance, Web Service. *BMC Genetics*, 6 (13), V.3.23. <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Jones, G. P., Milicich, M. J., Emslie, M. J., and Lunow, C. (1999). Self-Recruitment in a Coral Reef Fish Population. *Nature*, 402 (6763), 802–804.
- Jones, Geoffrey P., Planes, Serge, and Thorrold, Simon R. (2005). Coral Reef Fish Larvae Settle close to Home. *Current biology*. CB, 15(14), 1314–1318.
- Kessler, William S. (2006). The Circulation of the Eastern Tropical Pacific: A Review. *Progress in Oceanography*, 69 (2-4), 181–217.
- Knutsen, H., Jorde, P. E., André, C., and Stenseth, N. C. (2003). Fine-Scaled Geographical Population Structuring in a Highly Marine Species: The Atlantic Cod. *Molecular Ecology*, 12, 385–394.
- Lacson, J. M., Riccardi, V. M., Calhoun, S. W., and Morizot, D. C. (1989). Genetic Differentiation of Bicolor Damselfish (*Eupomacentrus Partitus*) Populations in the Florida Keys. *Marine Biology*, 103 (4), 445–451.
- Lee, W. J., Conroy, J., Howell, W. H., and Kocher, T. D. (1995). Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *Journal of molecular evolution*, 41 (1), 54–66.

- Levin, Lisa A. (2006). Recent Progress in Understanding Larval Dispersal: New Directions and Digressions. *Integrative and Comparative Biology*, 46 (3), 282–297.
- Lôbo-Hajdu, G., Guimarães, A. C. R., Salgado, A., Lamarão, F. R. M., Vieiralves, T., Mansure, J. J., Albano, R. M. (2004). Intra-genomic, Intra and Interspecific Variation in the rDNA ITS of Porifera Revealed by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *Bollettino dei Musei e Degli Istituti Biologici dell'Università di Genova*, 2003, 413–423.
- López-Legentil, S., and Pawlik, J. R. (2009). Genetic Structure of the Caribbean Giant Barrel Sponge *Xestospongia Muta* Using the I3-M11 Partition of COI. *Coral Reefs*, 28 (1), 157–165.
- Lowe, Winsor H., and Allendorf, Fred W. (2010). What Can Genetics Tell Us about Population Connectivity? *Molecular Ecology*, 19 (15), 3038–3051.
- Maldonado, Manuel. (2006). The Ecology of the Sponge Larva. *Canadian Journal of Zoology*, 84, 175–194.
- Manel, Stéphanie, Schwartz, Michael, Luikart, Gordon, and Taberlet, Pierre. (2003). Landscape Genetics: Combining Landscape Ecology and Population Genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (4), 189–197.
- Mariani, S., Piscitelli, M., and Uriz, M. (2001). Temporal and Spatial Co-Occurrence in Spawning and Larval Release of *Cliona Viridis* (Porifera: Hadromerida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81, 565–567.
- Mariani, S. (2005). The Dynamics of Sponge Larvae Assemblages from Northwestern Mediterranean Nearshore Bottoms. *Journal of Plankton Research*, 27 (3), 249–262.
- Mariani, S., Uriz M., and Turon, X. (2000). Larval Bloom of the Oviparous Sponge *Cliona Viridis*: Coupling of Larval Abundance and Adult Distribution. *Marine Biology*, 137 (5-6), 783–790.
- Mora, C., and Sale, P. (2011). Ongoing Global Biodiversity Loss and the Need to Move beyond Protected Areas: A Review of the Technical and Practical Shortcomings of Protected Areas on Land and Sea. *Marine Ecology Progress Series* 434, 251–266.
- Munguia-Vega, Adrian, Jackson, Alexis, Marinone, Silvio Guido, Erisman, Brad, Moreno-Baez, Marcia, Girón-Nava, Alfredo, Pfitser, Tad, Aburto-Oropeza, Octavio, Torre, Jorge. (2014). Asymmetric Connectivity of Spawning Aggregations of a Commercially Important Marine Fish Using a Multidisciplinary Approach. *PeerJ*, (2011), 2–33.
- Nava, Héctor, and Carballo, José Luis. (2008). Chemical and Mechanical Bioerosion of Boring Sponges from Mexican Pacific Coral Reefs. *The Journal of experimental biology*, 211 (Pt 17), 2827–2831.

- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, NY, USA: Columbia University.
- Noyer, Charlotte, and Becerro, Mikel A. (2012). Relationship between Genetic, Chemical, and Bacterial Diversity in the Atlanto-Mediterranean Bath Sponge *Spongia Lamella*. *Hydrobiologia*, 687 (1), 85–99.
- Van Oosterhout, Cock, Hutchinson, William, Wills, Derek, and Shipley, Peter. (2004). MICRO-CHECKER: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes*, 4 (3), 535–538.
- Ospina-Guerrero, S. P., Landinez-García, R. M., Rodríguez-Castro, D. J., Arango, R., Márquez, E. (2008). Genetic Connectivity of *Stegastes Partitus* in the South Caribbean Evidenced by Microsatellite Analysis. *Ciencias Marinas*, 34 (2), 155–163.
- Paris, C. B., Cowen, R. K., Claro, R., and Lindeman, K. (2005). Larval Transport Pathways from Cuban Spawning Aggregations (Snappers; Lutjanidae) Based on Biophysical Modeling. *Marine Ecology Progress Series*, 296 (93-106), 93–106.
- Paris, Claire B., and Cowen, Robert K. (2004). Direct Evidence of a Biophysical Retention Mechanism for Coral Reef Fish Larvae. *Limnology and Oceanography*, 49 (6), 1964–1979.
- Park, S. D. E. (2001). Trypanotolerance in Western African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. University of Dublin, Ireland.
- Paz-García, D., Chávez-Romo, H., Correa-Sandoval, F., Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, A., Medina-Rosas, P., Hernández-Cortés, M. (2012). Genetic Connectivity Patterns of Corals *Pocillopora damicornis* and *Porites panamensis* (Anthozoa: Scleractinia) Along the West Coast of Mexico. *Pacific Science*, 66(1), 43–62.
- Pelc, R. A., Warner, R. R., and Gaines, S. D. (2009). Geographical Patterns of Genetic Structure in Marine Species with Contrasting Life Histories. *Journal of Biogeography*, 36, 1881–1890.
- Pennington, J. Timothy, Mahoney, Kevin L., Kuwahara, Victor S., Kolber, Dorota D., Calienes, Ruth, Chavez, Francisco P. (2006). Primary Production in the Eastern Tropical Pacific: A Review. *Progress in Oceanography*, 69, 285–317.
- Pineda, Jesús, Hare, Jonathan, and Sponaugle, Su. (2007). Larval Transport and Dispersal in the Coastal Ocean and Consequences for Population Connectivity. *Oceanography*, 20 (3), 22–39.
- Planes, S., Borsa P., Galzin, R., and Bonhomme, F. (1994). Geographic Structure and Gene Flow in the Manini (Convict Surgeonfish, *Acanthurus Triostegus*) in the South-Central Pacific. *Genetics and Evolution of aquatic organism*, 113–122.

- Planes, S., and Fauvelot, C. (2002). Isolation by Distance and Vicariance Drive Genetic Structure of a Coral Reef Fish in the Pacific Ocean. *Evolution*, 56 (2), 378–399.
- Planes, S., Galzin, R., and Bonhomme, F. (1996). A Genetic Metapopulation Model for Reef Fishes in Oceanic Islands: The Case of the Surgeonfish, *Acanthurus Triostegus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 9, 103–117.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155 (2), 945–959.
- Purcell, J. F., Cowen, R. K., Hughes, C. R., and Williams, D. A. (2009). Population Structure in a Common Caribbean Coral-Reef Fish: Implications for Larval Dispersal and Early Life-History Traits. *Journal of Fish Biology*, 74 (2), 403–417.
- Purcell, John F. H., Cowen, Robert K., Hughes, Colin R., and Williams, Dean A. (2006). Weak Genetic Structure Indicates Strong Dispersal Limits: A Tale of Two Coral Reef Fish. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273 (1593), 1483–1490.
- Ramon, Marina L., Nelson, Peter A., Martini, Edward, Walsh, William J., Bernardi, Giacomo. (2008). Phylogeography, Historical Demography, and the Role of Post-Settlement Ecology in Two Hawaiian Damselfish Species. *Marine Biology*, 153 (6), 1207–1217.
- Raymond, M., and Rousset, F. (1995). Genepop (Version-1.2) Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 86 (3), 248–49. <Go to ISI>://A1995RB30200017.
- Reitzel, Adam M., Miner, Benjamin G., and McEdward, Larry R. (2004). Relationships between Spawning Date and Larval Development Time for Benthic Marine Invertebrates: A Modeling Approach. *Marine Ecology Progress Series*, 280 (August), 13–23.
- Reyes-Bonilla, H., and López-Pérez, A. (1998). Biogeografía de Los Corales Pétreos (Scleractinia) Del Pacífico de México. *Ciencias Marinas*, 24 (2), 211–224.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- Roberts, C. M. (1997). Connectivity and Management of Caribbean Coral Reefs. *Science*, 278, 1454–1457.
- Rosenberg, Noah, and Nordborg, Magnus. (2002). Genealogical Trees, Coalescent Theory and the Analysis of Genetic Polymorphisms. *Nature reviews. Genetics*, 3, 380–390.
- Rozas, Julio, Sánchez-DelBarrio, Juan, Messeguer, Xavier, and Rozas, Ricardo. (2003). DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics*, 19 (18), 2496–2503.

- Rua, Cintia, Zilberberg, Carla, and Solé-Cava, Antonio. (2011). New Polymorphic Mitochondrial Markers for Sponge Phylogeography. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91 (05), 1015–1022.
- Saavedra-Sotelo, N. C., Calderón-Aguilera, L. E., Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, R. A., Medina-Rosas, P., Rocha-Olivares, A. (2011). Limited Genetic Connectivity of *Pavona Gigantea* in the Mexican Pacific. *Coral Reefs*, 30 (3), 677–686.
- Saavedra-Sotelo, Nancy C. (2013). Viviendo en el límite: evaluación del efecto de hábitats marginales en la diversidad y diferenciación genética de corales hermatípicos en el Golfo de California y el Pacífico mexicano. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 124 p.
- Saavedra-Sotelo, Nancy C., Calderón-Aguilera, Luis E., Reyes-Bonilla, Héctor, Paz-García, David A., López-Pérez, Ramón A., Cupul-Magaña, Amilcar, Cruz-Barraza, José A., Rocha-Olivares, Axayácatl. (2013). Testing the Genetic Predictions of a Biogeographical Model in a Dominant Endemic Eastern Pacific Coral (*Porites Panamensis*) Using a Genetic Seascape Approach. *Ecology and evolution*, 3 (12), 4070–4091.
- Salas, Eva, Molina-Ureña, Helena, Walter, Ryan P., and Heath, Daniel D. (2010). Local and Regional Genetic Connectivity in a Caribbean Coral Reef Fish. *Marine Biology*, 157 (2), 437–445.
- Sale, Peter, Hanskib, Ilkka, and Kritzer, Jacob. (2006). *Marine Metapopulations*. (pp. 31-61). San Diego, California. Elsevier.
- Schönberg, C. H. L., and Ortiz, J. C. Is Sponge Bioerosion Increasing?. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida, 7-11 July 2008*.(16), 520–523.
- Schuelke, Markus. (2000). An Economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments. *Nature biotechnology*, 18, (2), 233-234.
- Schultz, E. T., and Cowen, R. K. (1994). Recruitment of Coral-Reef Fishes to Bermuda: Local Retention or Long-Distance Transport. *Marine Ecology Progress Series*, 109 (1), 15–28.
- Slatkin, Montgomery. (1993). Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations Montgomery Slatkin. *Evolution*, 47 (1), 264–279.
- . (1994). Gene Flow and Population Structure. *In: Montgomery, Slatkin. Ecological Genetics*. L. Real, Princeton .
- Sole-Cava, Antonio M., and Boury-Esnault, Nicole. (1999). Patterns of Intra and interspecific genetic divergence in marine sponges. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44, 591–601.

- Steiner, S. C. C., and Cortés, J. (1996). Spermatozoan Ultrastructure of Scleractinian Corals from the Eastern Pacific: Pocilloporidae and Agariciidae. *Coral Reefs*, 15 (2), 143–147.
- Swearer, Stephen E., Caselle, Jennifer E., Lea, David W., and Warner, Robert R. (1999). Larval Retention and Recruitment in an Island Population of a Coral-Reef Fish. *Nature*, 402, 799–802.
- Tamura, Koichiro, Peterson, Daniel, Peterson, Nicholas, Stecher, Glen, Nei, Masatoshi, and Kumar, Sudhir. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*, 28 (10), 2731–2739.
- Taylor, Michael S., and Hellberg, Michael E. (2003). Genetic Evidence for Local Retention of Pelagic Larvae in a Caribbean Reef Fish. *Science*, 299 (5603), 107–109.
- Thiel, M., and Haye, P. (2006). The Ecology of Rafting in the Marine Environment. III. Biogeographical and Evolutionary Consequences. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 44, 323–429.
- Thiessen, Roger J., and Heath, Daniel D. (2006). Characterization of One Trinucleotide and Six Dinucleotide Microsatellite Markers in Bicolor Damselfish, *Stegastes Partitus*, a Common Coral Reef Fish. *Conservation Genetics* 8(4): 983–985.
- Thorrold, S. R., Latkoczy, C., Swart, P. K., and Jones, C. M., (2001). Natal Homing in a Marine Fish Metapopulation. *Science*, 291 (5502), 297–299.
- Thorrold, Simon R., Jones, Geoffrey P., Hellberg, Michael E., Burton, Ronald S., Swearer, Stephen E., Neigel, Joseph E., Morgan, Steven G., Warner, Robert R. (2002). Quantifying Larval Retention and Connectivity in Marine Populations with Artificial and Natural Markers. *Bulletin of Marine Science* 70 (1 SUPPL.), 291–308.
- Thorrold, Simon, Zacherl, Danielle, and Levin, Lisa. (2007). Population Connectivity and Larval Dispersal Using Geochemical Signatures in Calcified Structures. *Oceanography*, 20 (3), 80–89.
- Urbiola-Rangel, Erika, Chassin-Noria, Omar. (2013). Connectivity of *Stegastes Acapulcoensis* (Pomacentridae) on Mexican Central Pacific. *Hidrobiológica*, 23 (3), 275–279.
- Uriz, Maria J., and Turon, Xavier., (2012). Sponge Ecology in the Molecular Era. *Advances in marine biology*, 61, 345–410.
- Uriz, María J., Maldonado, Manuel, Turon, Xavier, and Martí, Ruth. (1998). How Do Reproductive Output, Larval Behaviour, and Recruitment Contribute to Adult Spatial Patterns in Mediterranean Encrusting Sponges?. *Marine Ecology Progress Series*, 167, 137–148.

- Uriz, Maria, and Turon, Xavier. (2012). Sponge Ecology in the Molecular Era. *Advances in Marine Biology*, 61, 345–410.
- Uriz, Maria, Turon, Xavier, and Mariani, Simone. (2008). Ultrastructure and Dispersal Potential of Sponge Larvae: Tufted versus Evenly Ciliated Parenchymellae. *Marine Ecology*, 29 (2), 280–297.
- Villegas-Sánchez, C., Rivera-Madrid, R., and Arias-González, J. (2010). Small-Scale Genetic Connectivity of Bicolor Damselfish (*Stegastes Partitus*) Recruits in Mexican Caribbean Reefs. *Coral Reefs*, 29 (4), 1023–1033.
- Villegas-Sánchez, C., Pérez-España, H., Rivera-Madrid, R., Salas-Monreal, D., Arias-González, J. E. (2013). Subtle Genetic Connectivity between Mexican Caribbean and South-Western Gulf of Mexico Reefs: The Case of the Bicolor Damselfish, *Stegastes Partitus*. *Coral Reefs*, 33 (1), 241–251.
- Waples, R. S. (1998). Patterns of Genetic Differentiation in High. *The American Genetic Association*, 89, 438–450.
- Waples, Robin S., and Gaggiotti, Oscar. (2006). What Is a Population? An Empirical Evaluation of Some Genetic Methods for Identifying the Number of Gene Pools and Their Degree of Connectivity. *Molecular Ecology*, 15 (6), 1419–1439.
- Warner, R. R., and Cowen, R. K. (2002). Local Retention of Production in Marine Populations: Evidence, Mechanisms, and Consequences. *Bulletin of Marine Science*, 70 (1), 245–249.
- Weersing, K., and Toonen, R. (2009). Population Genetics, Larval Dispersal, and Connectivity in Marine Systems. *Marine Ecology Progress Series* 393: 1–12.
- Wellington, G. M., and Victor, B. C. (1989). Planktonic Larval Duration of One Hundred Species of Pacific and Atlantic Damselfishes (Pomacentridae). *Marine Biology*, 101 (4), 557–567.
- . 1992. Regional Differences in Duration of the Planktonic Larval Stage of Reef Fishes in the Eastern Pacific Ocean. *Marine Biology* 113 (3), 491–498.
- Whalan, S., Johnson, M., Harvey, E., and Battershill, C. (2005). Mode of Reproduction, Recruitment, and Genetic Subdivision in the Brooding Sponge *Haliclona* Sp. *Marine Biology*, 146 (3), 425–433.
- White, Crow, Selkoe, Kimberly A., Watson, James, Siegel, David A., Zacherl, Danielle C., Toonen, Robert J. (2010). Ocean Currents Help Explain Population Genetic Structure. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277 (1688), 1685–1694.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, W. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H.

- Gelfand, J. J. Snninsky, and T. J. White (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. (pp. 315-322). Academic Press.
- Williams, D. A., Purcell, J., Hughes, C. R., and Cowen, R. K. (2003). Polymorphic Microsatellite Loci for Population Studies of the Bicolor Damselfish, *Stegastes Partitus* (Pomacentridae). *Molecular Ecology Notes*, 3 (4), 547–549.
- Wisshak, Max, Schönberg, Christine, Form, Armin, and Freiwald, André. (2012). Ocean Acidification Accelerates Reef Bioerosion. *PLoS One*, 7 (9), 3–10.
- Wörheide, Gert. (2006). Low Variation in Partial Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) Mitochondrial Sequences in the Coralline Demosponge *Astrosclera Willeyana* across the Indo-Pacific. *Marine Biology*, 148 (5), 907–912.
- Wörheide, Gert, Epp, Laura, and Macis, Luciana. (2008). Deep Genetic Divergences among Indo-Pacific Populations of the Coral Reef Sponge *Leucetta Chagosensis* (Leucettidae): Founder Effects, Vicariance, or Both? *BMC evolutionary biology*, 8, 24.
- Wörheide, Gert, Nichols, Scott, and Goldberg, Julia. (2004). Intragenomic Variation of the rDNA Internal Transcribed Spacers in Sponges (Phylum Porifera): Implications for Phylogenetic Studies. *Molecular phylogenetics and evolution*, 33 (3), 816–830.
- Wright, Jonathan, and Bentzen, Paul. (1994). Microsatellites: Genetic Markers for the Future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4 (3), 384–388.
- Xavier, J. R., Rachello-Dollmen, P. G., Parra-Velandia, F., Schönberg, C. H. L., Breeuwer, J. A. J., van Soest, R. W. M. (2010b). Molecular Evidence of Cryptic Speciation in the ‘Cosmopolitan’ Excavating Sponge *Cliona Celata* (Porifera, Clionidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 56 (1), 13–20.
- Xavier, Joana R., Rachello-Dolmen, P. G., Parra-Velandia, F., Schönberg, C. H. L., Breeuwer, J. A. J., van Soest, R. W. M. (2010a). Phylogeography, Genetic Diversity and Structure of the Poecilosclerid Sponge *Phorbas Fictitius* at Oceanic Islands. *Contributions to Zoology*, 79 (3), 119–129.
- Zhang, Zhenglian, Huang, Kai, Zhang, Yuying, Liu, Nianjuan, and Yang, Kaiyu. (1994). Interference by Complex Structures of Target DNA with Specific PCR Amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 44 (1), 15–20.
- Zilberberg, C., Maldonado, M. and Solé-Cava, A. (2006). Assessment of the Relative Contribution of Asexual Propagation in a Population of the Coral-Excavating Sponge *Cliona Delitrix* from the Bahamas. *Coral Reefs*, 25 (2), 297–301.