



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

---

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FILOGEOGRAFÍA DE *Elacatinus puncticulatus*  
(TELEOSTEI, GOBIIDAE) EN EL PACÍFICO ORIENTAL  
TROPICAL**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN)**

**P R E S E N T A**

**BIOL. EDGAR RAÚL SANDOVAL HUERTA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DOCTOR EN CIENCIAS OMAR DOMÍNGUEZ DOMÍNGUEZ**

**MORELIA, MICHOACÁN**

**DE FEBRERO DE 2014**



## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
I.I. Fenómenos de aislamiento: Las barreras geográficas .....	3
I.II. El Pacífico Oriental Tropical .....	5
I. III. Discontinuidades de hábitat: Las brechas arenosas .....	6
I.IV. Procesos oceanográficos .....	9
I.V. Especie de estudio: <i>Elacatinus puncticulatus</i> .....	14
I.VI. Análisis Filogeográfico .....	16
II. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS EXPLÍCITAS .....	19
III. OBJETIVOS .....	19
III.I. Objetivo general.....	19
III.II. Objetivos Particulares.....	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
IV.I. Poblaciones muestreadas. ....	20
IV.II. Amplificación y secuenciación.....	22
IV.III. Análisis de datos moleculares.....	23
Cytb.....	23
RC y ADN Nuclear .....	26
V. RESULTADOS .....	28
V.I. Muestras obtenidas .....	28
V.II. ADN Mitocondrial .....	28
Cytb.....	28
RC.....	43
V.III. ADN Nuclear .....	47
<i>Rho</i> .....	47
<i>S7</i> .....	50
VI. DISCUSIÓN .....	54
Diversidad genética .....	54
Demografía histórica y expansión poblacional .....	56
Inferencia biogeográfica .....	56
Implicaciones taxonómicas .....	63
Conservación.....	63
VII. CONCLUSIONES .....	65
VIII. LITERATURA CITADA .....	67
IX. APÉNDICE .....	77

## RESUMEN

Para identificar y determinar la eficiencia de Barreras Oceánico-Geográficas, se realizó un estudio filogeográfico del gobio cabeza roja *Elacatinus puncticulatus* (Teleostei, Gobiidae), mediante marcadores moleculares de ADN mitocondrial (ADNmt) y nuclear (ADNn). Se obtuvieron 117 secuencias de 1140 pb de citocromo b (Cytb), 37 secuencias de la región control (RC) (407 pb), 11 de la rodopsina (Rho) (816 pb) y 29 del intrón 1 del gen de la proteína ribosomal S7 (735 pb). Los índices de diversidad haplotípica ( $H_d$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el promedio de diferencias nucleotídicas para el total de individuos fueron notablemente mayores ( $H_d=0.959$ ;  $\pi=0.0112$ ;  $k=12.751$ ) en Cytb, que para la Rho ( $H_d=0.615$ ;  $\pi=0.0010$ ;  $k=0.846$ ) y S7 ( $H_d=0.628$ ;  $\pi=0.0011$ ;  $k=0.798$ ), siendo incluso mayores a los de la RC ( $H_d=0.664$ ;  $\pi=0.0065$ ;  $k=2.623$ ). La Provincia Mexicana mostró valores mayores de diversidad genética para Cytb y S7, mientras que la Provincia Panámica resultó con mayores valores para la RC y Rho. Por marcador, Cytb fue el único con valores de  $H_d$  mayores a 0.5 para las tres provincias y para la mayoría de las poblaciones. La D de Tajima no rechazó el modelo neutral para el total de las secuencias de Cytb ( $D=-0.674$ ,  $P=0.278$ ), sin embargo la F de Fu fue significativamente negativa ( $F=-24.173$ ,  $P=0.001$ ). Los resultados del análisis de la distribución de diferencias pareadas, la alta diversidad haplotípica ligada a una baja diversidad nucleotídica y los valores negativos de la F de Fu sugieren una expansión poblacional reciente. Los análisis filogenéticos a través de Neighbor-Joining, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana de Coalescencia, identificaron una división entre las poblaciones de las Provincias de Cortés y Mexicana con respecto de la Provincia Panámica que los separó en dos clados. Además, se identificó una subdivisión en la Provincia Panámica que separa a Costa Rica y Panamá de Ecuador. La red de los 65 haplotipos identificados, mostró dos haplogrupos principales que corresponden al análisis filogenético, entre estos dos grupos, no existen haplotipos compartidos. Se encontraron haplotipos provenientes de la Provincia Mexicana genéticamente relacionados en mayor medida con la Provincia de Cortés. Las distancias genéticas estimadas de Cytb entre los individuos de las provincias de Cortés y Mexicana, con respecto a los de la Provincia Panámica, fueron de entre 2.17 y 2.23%. Las distancias entre las provincias de Cortés y Mexicana fueron de 0.1 a 0.38%. Los estadísticos  $F_{ST}$ , AMOVA y SAMOVA, reafirmaron la marcada estructura genética entre los clados y subdivisiones mostrados por los árboles filogenéticos y redes de haplotipos. La diferenciación genética encontrada entre provincias y entre Centroamérica y Ecuador, evidenció fenómenos de aislamiento para *E. puncticulatus* ocasionados por procesos oceanográficos persistentes que han actuado en diferentes escalas de tiempo. La estructura filogeográfica encontrada entre la Provincia Mexicana y la Provincia Panámica estaría determinada por la formación de giros, que ocurren entre las costas del Golfo de Tehuantepec y el Golfo de Papagayo. La división entre los haplotipos de Centroamérica y Ecuador, involucraría giros formados por chorros de viento que atraviesan Panamá y giros formados por mecanismos de vorticidad e inestabilidad resultado de la convergencia entre corrientes. Finalmente, la diferenciación genética baja pero significativa entre las poblaciones de las provincias de Cortés y Mexicana, podría ser resultado de la retención y dispersión ocasionada por giros y surgencias generados por sistemas oceánicos que convergen en la entrada del Golfo de California. La estimación de los tiempos de divergencia indica que la división entre las poblaciones de las provincias Mexicana y Panámica (313-873 mil años) y entre Centroamérica y Ecuador (75-300 mil años) posiblemente ocurrió durante el Pleistoceno Medio (130-780 mil años). Junto con la inestabilidad en el nivel del océano, la variabilidad espacial y temporal en los patrones de transferencia de calor en el océano, pudieron generar alteraciones de hábitat responsables del desplazamiento y reducción de poblaciones de peces arrecifales. Los cambios en las condiciones climáticas o variaciones en los patrones de corrientes pudieron aislar a las poblaciones por periodos suficientes para generar diferenciación alopátrica. Desde el punto de vista taxonómico, la evidencia obtenida sugiere la existencia de un complejo de dos especies que integraría *E. puncticulatus*, la realización de estudios posteriores con datos morfológicos y/o merísticos podrían respaldar esta hipótesis.

**Palabras clave:** estructura genética, barreras oceanográficas, gobio cabeza roja, Pacífico Oriental Tropical

**SUMMARY**

Geographic barriers to the dispersal of individuals can generate or maintain genetic structure among populations. In the Tropical Eastern Pacific, Central American and Sinaloan gaps, are described as discontinuities responsible for limiting the movement of reef fishes and obstruct the dispersal of pelagic larvae to prevent the establishment. These gaps delimit the continental regionalization of the POT, dividing it into three provinces: Cortez, Mexican and Panamic. However, there are other factors that can act as movement barriers to fishes with semibenthonic characteristics. Oceanographic processes such as currents, gyres and upwelling can promote local retention of pelagic larvae. To identify and determine the efficiency of Ocean- Geographical Barriers, a phylogeographic study of red head goby *Elacatinus puncticulatus* (Teleostei, Gobiidae) was performed using molecular markers of mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA). Were obtained 117 cytochrome b (Cytb) sequences (1140 bp), 37 Control Region (CR) sequences (407 bp), 11 rhodopsin (Rho) gene nuclear sequences (816 bp) and 29 sequences of intron 1 of the gene of the ribosomal protein S7 (735 bp). Haplotype diversity indices (Hd), nucleotide diversity ( $\pi$ ) and the average nucleotide differences (k), for the total of individuals were significantly greater (Hd=0.959;  $\pi$ =0.0112; k=12.751) in Cytb to that shown by the sequences of Rho (Hd=0.615;  $\pi$ =0.0010; k=0.846) and S7 (Hd=0.628;  $\pi$ =0.0011; k=0.798), being even higher than CR (Hn=0.664;  $\pi$ =0.0065; k=2.623). The Mexican Province showed higher values of genetic diversity for Cytb and S7, while the Panamic Province was higher values for RC and Rho. By marker, Cytb was the only with Hd higher than 0.5 for the three provinces and for most populations. Tajima's D not rejected neutral model for total Cytb data set (D=-0.6736, P=0.278), but Fu's F were significantly negative (F=-24.173, P=0.001). Results of Mismatch Distributions, high  $H_d$  with low  $\pi$  and negative Fu's F values suggest a recent population expansion. Phylogenetic analysis through Neighbor Joining, Maximum Likelihood and Bayesian inference of coalescence, identified a division between the populations from Cortez and Mexican Provinces respect to the Panamic Province, separating them into two clades. In addition, into the Province Panamic one subdivision was identified, separating Costa Rica and Panama (Central America) from Ecuador. The network of the 65 haplotypes identified two major haplogroups corresponding to phylogenetic analysis; between these two groups, there were no shared haplotypes. Some haplotypes from the Mexican Province were more genetically related with the Cortez Province. Estimated Cytb genetic distances between individuals Cortez and Mexican Province, with respect to those of Panamic Province, were between 2.17 and 2.23%. Distances between populations of Cortez and Mexican Province were 0.1 to 0.38%. The FST, AMOVA and SAMOVA reaffirmed the strong genetic structure among clades and subdivisions shown by phylogenetic trees and haplotype networks. The genetic differentiation found between provinces and between Central America and Ecuador, showed isolation phenomena for *E. puncticulatus* caused by persistent oceanographic processes that have acted on different time scales. The phylogeographic structure found between the Mexican and Panamic Provinces would be determined by the formation of eddies, which occur between Tehuantepec's Gulf and Papagayo's Gulf. The division between haplotypes in Central America and Ecuador, involve eddies formed by wind jets crossing Panama and eddies formed by mechanisms of vorticity and instability result of the convergence of currents. Finally, the low but significant genetic differentiation among populations of the Cortez and Mexican Provinces, could be a result of the larval retention and dispersion caused by eddies and oceanic upwelling generated by systems that converge at the entrance of the Gulf of California. The estimated divergence times suggests that the division between the populations of the Mexican and Panamic Provinces (313-873 thousand years) and between Central America and Ecuador (75-300 thousand years) possibly occurred during the Middle Pleistocene (130 -780,000 years). Together with the instability in the ocean level, spatial and temporal variability in patterns of heat transfer in the ocean, could generate habitat alterations responsible for the displacement and reduction of reef fish populations. Changes in climatic conditions or changes in the patterns of currents could isolate populations for sufficient periods to generate allopatric differentiation. From the taxonomic point of view, the evidence obtained suggests the existence of a complex of two species that integrate *E. puncticulatus*. Conducting further studies with morphological and/or meristic data could support this hypothesis.

**Keywords:** genetic structure, oceanographic barriers, red head goby, Tropical Eastern Pacific

## I. INTRODUCCIÓN

### I.I. Fenómenos de aislamiento: Las barreras geográficas

La especiación es un proceso que implica la divergencia genética de dos poblaciones debido al aislamiento reproductivo (Frankham *et al.*, 2002), lo que contribuye al establecimiento de linajes evolutivamente independientes. De esta manera, las poblaciones que se mantienen genéticamente diferentes durante escalas de tiempo evolutivo, pueden originar nuevas especies (Slatkin, 1994). En la mayoría de los casos la especiación involucra escenarios de aislamiento físico como consecuencia de fenómenos geográficos (barreras), o de dispersión de organismos a territorios nuevos (efecto fundador). En este caso la especiación se denomina como alopátrica y por mucho tiempo fue considerada como el proceso más común en la formación de especies (Mayr, 1963).

El levantamiento de montañas, la desertificación, los cambios de los ríos y la deriva continental son barreras geográficas que se presentan en el medio terrestre. En el medio marino las barreras funcionan de la misma manera, restringiendo el movimiento de organismos. Sin embargo, el ambiente marino es un hábitat continuo y se evidencian pocos factores que puedan limitar la dispersión. Un ejemplo, es el cierre del Portal de Bolívar en Centroamérica y la posterior separación del océano Pacífico Oriental y del Atlántico Occidental. Este proceso se inició hace 12 millones de años (m. a.) y finalizó en el Plioceno hace aproximadamente 3.1 a 3.5 m. a. (Coates *et al.*, 2005). El resultado de la separación de las poblaciones divididas por el Istmo fue la diferenciación genética entre especies (Bermingham y Lessios, 1993; Lessios, 2008). Al igual que las masas continentales, las grandes extensiones oceánicas implican un obstáculo para las especies que no son capaces de realizar incursiones mar adentro. Existen además otros procesos que pueden limitar el movimiento de organismos en el océano, las corrientes y los gradientes de salinidad y temperatura por ejemplo, establecen los límites de distribución de las especies marinas. Estos factores se combinan para limitar o en algunos casos, potenciar la capacidad de dispersión de las especies (Palumbi, 1992, 1994; Hellberg *et al.*, 2002).

La dispersión de los organismos marinos involucra el movimiento en un medio continuo de huevos, larvas, individuos juveniles y adultos. En el caso de los peces, existen diferentes estrategias de dispersión que dependen de la historia de vida y de las características particulares de cada especie. A diferencia de teleósteos de gran tamaño y de hábitos demersales, como dorados, atunes y marlines (Heist, 2004; Duncan *et al.*, 2006), la

mayoría de las especies arrecifales son peces pequeños con hábitos semibentónicos, que carecen de la capacidad de desplazarse grandes distancias (Carr, 1991). La mayoría de las especies arrecifales presentan una fuerte asociación a los sitios que habitan como adultos, sin embargo presentan una etapa pelágica en la fase temprana de su ciclo de vida. Después de establecerse en el arrecife durante su etapa juvenil, el resto de su vida la desarrollan en refugios formados por el sustrato. Las especies con larva pelágica tienen un mayor potencial de dispersión, durante esta etapa son transportadas por las corrientes lejos del lugar donde eclosionaron. Por lo que las larvas pelágicas pueden interconectar las poblaciones distantes por medio de las corrientes oceánicas (Roberts, 1997). Esta gran capacidad de dispersión permite que las poblaciones presenten un alto flujo génico, incluso al estar separadas por miles de kilómetros (Cowen y Sponaugle, 2009). En los primeros estudios sobre dispersión, se asumía que las larvas se dispersaban como propágulos pasivos en el flujo de las corrientes (Roberts, 1997), sin embargo se ha demostrado la existencia de movimiento vertical con un efecto significativo en el transporte. Al modificar su distribución en la columna nadando verticalmente, las larvas pueden ser transportadas por diferentes corrientes lo que puede conducir a la retención o la propagación (Levin, 2006; Pineda *et al.*, 2007).

Al finalizar el periodo larval, los peces deben encontrar un hábitat arrecifal donde establecerse (Montgomery *et al.*, 2006). La transición de la fase pelágica a la fase adulta sedentaria es un periodo crítico en el desarrollo de estos organismos, lo que implica cambios en su morfología, hábitat y dieta. El éxito del reclutamiento depende de los requerimientos específicos de establecimiento y de la disponibilidad de hábitat adecuado. Por lo que, para el establecimiento de organismos que se han desplazado fuera de su zona de nacimiento, además de su capacidad para moverse a otros sitios, existen otros factores que influyen en su sobrevivencia, como lo es la selección del hábitat, la depredación, disponibilidad de refugio, presencia de con-específicos, tipo de sustrato y posición en la columna de agua (Carr, 1991; Harmelin-Vivien *et al.*, 1995). Debido a las características de los peces arrecifales, se considera que su capacidad de dispersión depende íntegramente de su etapa larvaria. Por esta razón, se cree que la restricción en el flujo genético debe presentarse durante esta etapa, siendo la dispersión de las larvas pelágicas la que resultaría afectada por cualquier posible barrera biogeográfica. De acuerdo con lo anterior, si consideramos que las zonas en la línea de costa que carecen de formaciones rocosas no son un hábitat adecuado para las especies arrecifales, se pensaría que las discontinuidades de hábitat formadas por grandes espacios que no presentan un litoral rocoso y en los que no existen arrecifes, pueden funcionar como barreras que reducen el intercambio de individuos entre poblaciones

(Riginos y Nachman, 2001; Craig *et al.*, 2006). En el Pacífico Oriental Tropical las brechas arenosas de Sinaloa y Centroamérica, también referidas como “Gaps”, se describen como discontinuidades de hábitat adecuado, que funcionan como barreras geográficas para las especies arrecifales (Hastings, 2000). A continuación se describen las características generales del Pacífico Oriental Tropical y se exponen los elementos biogeográficos que explican la hipótesis de las brechas arenosas.

### **I.II. El Pacífico Oriental Tropical**

La región biogeográfica del Pacífico Oriental Tropical (POT) (Briggs, 1974) se extiende desde Bahía Magdalena, Baja California Sur y el Sur del Golfo de California, hasta Cabo Blanco en la costa norte de Perú (Fig. 1). Las corrientes frías que fluyen desde latitudes altas hacia latitudes bajas (la corriente de California y la corriente costera de Perú) definen los límites norte y sur de la región (Glynn y Ault, 2000). El POT incluye además cinco grupos de islas: Revillagigedo, el Atolón de Clipperton, Cocos, Malpelo y el archipiélago de Galápagos. El límite occidental del POT está definido por la Barrera del Pacífico Oriental, una extensión de 5000 km de océano profundo que separa la isla más occidental de la región (Clipperton) con la más cercana de las islas del Pacífico Central, las Islas Line (Robertson *et al.*, 2004). A su vez el POT ha sido regionalizado en cuatro Provincias Biogeográficas: de Cortés, Mexicana, Panámica y Galápagos (Briggs, 1974; Hastings, 2000). La Provincia de Cortés corresponde a la parte Central y Sur del Golfo de California hasta Topolobambo, Sinaloa. Incluye la costa oriental la península de Baja California y la costa de Sonora y norte-centro de Sinaloa, además de las islas dentro del Golfo, hasta Topolobambo, Sinaloa. La Provincia Mexicana incluye la costa de México, desde Mazatlán (Sinaloa), hasta el inicio del Istmo de Tehuantepec (Oaxaca), en el sur de México. La Provincia Panámica se extiende desde el Golfo de Fonseca en el Sur de Nicaragua hasta el sur del Golfo de Guayaquil, en Perú. La Provincia de Galápagos incluye todas las islas del archipiélago ubicado a 1000 km de distancia de la costa de Ecuador (Walker, 1960; Brusca y Wallerstein, 1979). Estas provincias han sido propuestas con base a las especies endémicas que se han encontrado dentro de cada región. No obstante, la designación de provincias dentro del POT no está generalizada a todos los grupos de organismos marinos. La distribución de algunos invertebrados marinos implica que el POT es biogeográficamente



homogéneo, incluso otros estudios consideran a todo el POT como una única Provincia Panámica (Keen, 1971).

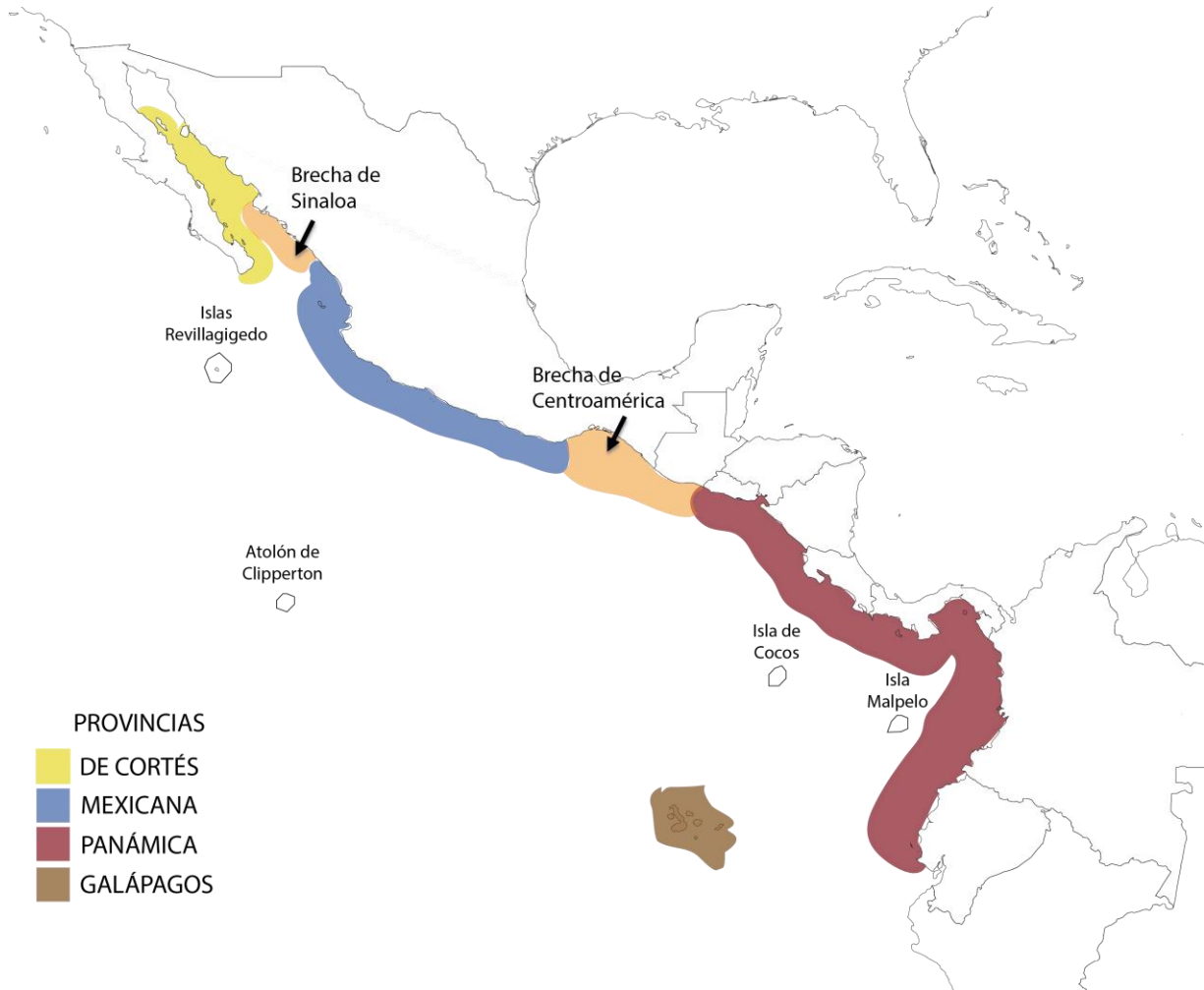


Figura 1. Regionalización biogeográfica del Pacífico Oriental Tropical incluye las provincias de Cortés, Mexicana, Panámica y de Galápagos (Briggs, 1974), denotando la ubicación de las brechas de Sinaloa y Centroamérica.

### I. III. Discontinuidades de hábitat: Los “Gaps” o Brechas de arena

La costa del POT no es continua, el litoral se interrumpe por dos grandes extensiones de playa arenosa: la brecha de Sinaloa y la brecha de Centroamérica. La brecha de Sinaloa tiene una amplitud de 370 km, se extiende desde del sur de Topolobambo, hasta Mazatlán, Sinaloa. La brecha de Centroamérica se extiende 1000 km, desde el sur del Istmo de Tehuantepec hasta el Golfo de Fonseca (Fig. 1). Estas barreras pueden representar un ambiente que impide la dispersión de especies arrecifales y/o limitar el establecimiento de

larvas debido a la distancia que tienen que viajar para encontrar un hábitat adecuado (Springer, 1959; Walker, 1960; Hastings, 2000). Se ha planteado que las brechas arenosas han jugado un papel determinante en los procesos de especiación de esta región, dividiendo las provincias continentales del POT (Rosenblatt, 1967; Brusca, 1980; Hastings, 2000). Hastings (2000) evaluó el nivel de similitud de las provincias con base en las especies compartidas de la familia Chaenopsidae, infiriendo que la ausencia de especies en una u otra provincia es el resultado del efecto restrictivo que las barreras tienen en la dispersión. De esta manera determinó cuales eran las barreras que presentan una mayor eficiencia como fenómenos de aislamiento. Un total de 33 especies de quenópsidos, se distribuyen en el POT incluyendo los hábitats insulares, de las cuales, 22 se encuentran restringidas a una sola provincia o a alguna de las islas o archipiélagos. Basándose en este grupo, las provincias de Cortés y de Panamá, exhiben niveles similares de endemismo, con aproximadamente un 50% del total. La Provincia Mexicana en cambio, presenta solamente una especie endémica, cuatro especies se comparten con la provincia de Cortés y dos con la provincia Panámica. Únicamente tres especies de quenópsidos se distribuyen en las tres provincias. Así, la barrera más efectiva sería la Brecha Pelágica, que divide el Archipiélago de Galápagos de la costa continental. Esta brecha ha sido atravesada solo por tres de las 33 especies analizadas. En segundo término se encuentra la Brecha de Centroamérica, la cual solo ha sido cruzada por cinco especies de 21 y finalmente la Brecha de Sinaloa, con un traslape de siete especies de las 17 adyacentes. De ésta manera se presume que las Brechas de Sinaloa y Centroamérica están implicadas en tres eventos de especiación cada uno, mientras que la Brecha Pelágica está involucrada en tres eventos de especiación entre costas insulares y continentales además de un evento totalmente inter insular.

Con el objetivo de evaluar la existencia y límites de las provincias biogeográficas mencionadas, se han realizado estudios que involucran datos de presencia y ausencia de especies, usando agrupamientos jerárquicos optimizados con análisis de similitud. En este sentido, Robertson y Cramer (2009) examinaron la subdivisión biogeográfica del POT, identificando solo dos provincias continentales, la Provincia de Cortés y la Provincia Panámica, además de una provincia insular: la Provincia de las Islas Oceánicas, que agrupa todas las islas y archipiélagos. En esta clasificación no está representada la Provincia Mexicana y las especies que pertenecían a esta provincia, fueron agrupadas con las de la Provincia Panámica.

Sin embargo, la delimitación de las provincias del POT y la influencia de las brechas arenosas no puede ser aplicada a todas las especies de peces, ya que las diferencias en las

características de cada especie (e. g. duración de la larva pelágica, capacidad de natación) plantean diversos escenarios de dispersión. Además, los estudios basados en listados obtenidos de bibliografía pierden confiabilidad pues no son homogéneos en los métodos de captura y corren el riesgo de subestimar la diversidad en las zonas carentes de información. Por otro lado, la evaluación de la eficiencia de las barreras geográficas, así como la inferencia en los eventos de especiación basándose únicamente en datos de presencia y ausencia pueden resultar imprecisas, debido a que no toman en cuenta eventos de extinción, procesos de especiación simpátrica o áreas carentes de información. Por lo que, un enfoque histórico-evolutivo podría ser más preciso al momento de designar los límites entre regiones, basándose en la distribución de linajes evolutivos, más que las especies por si solas.

En este contexto, Craig *et al.* (2006), evaluaron la eficiencia de las brechas arenosas como barreras geográficas, por medio de datos moleculares. Analizando la diferenciación genética entre dos especies de meros del género *Epinephelus* (Serranidae) mediante secuencias del gen mitocondrial citocromo b; encontraron que las brechas arenosas de Sinaloa y Centroamérica no afectan la capacidad de dispersión de estas especies. Se infirió que la falta de estructuración genética se debió a que estas especies poseen larvas pelágicas de larga duración. Se ha argumentado que la duración de la larva pelágica juega un papel crítico en el grado de conectividad entre poblaciones (Montgomery *et al.*, 2006; Cowen y Sponaugle, 2009; White *et al.*, 2010) sin embargo, existen estudios que sugieren que estos atributos no son necesariamente determinantes para la conectividad. Victor y Wellington (2000) registraron la duración de la larva pelágica de 49 especies costeras del POT, pertenecientes a la familia Pomacentridae y Labridae. Se encontró que muchas especies endémicas de una pequeña región poseían los estadios larvarios más extensos, mientras que las especies con los intervalos de distribución más amplios, tenían fases larvarias cortas.

Además de las discontinuidades de hábitat y las características de la larva pelágica, existen otros factores que pueden influir en la fragmentación de las poblaciones de organismos marinos. En este sentido, los procesos oceanográficos de mesoescala representan un importante factor en los patrones de dispersión de las larvas; por ejemplo: las corrientes, las surgencias costeras y los giros oceánicos, pueden incrementar o reducir el potencial de propagación de la larva. Los procesos que intervienen en la dinámica oceanográfica del POT, son inherentes unos a otros y deben ser analizados de manera integral para determinar los factores que intervienen de mayor manera en la fragmentación o conectividad de las poblaciones de organismos marinos.

#### I.IV. Procesos oceanográficos

Las corrientes y giros oceánicos son considerados como responsables de influir en la dispersión y retención de larvas pelágicas de organismos marinos (Rocha *et al.*, 2005; Taylor y Hellberger, 2006; Floeter *et al.*, 2008). El patrón general de corrientes oceánicas se basa en el movimiento de las corrientes norte y sur, originado por el calentamiento del océano que ocurre en el ecuador (Munk, 1950). Los calentamientos diferenciales causados por la radiación, generan diferencias de presión (mayor temperatura igual a menor presión). Junto con los movimientos iniciales que se desplazan de los polos al ecuador (Munk, 1950) se suma el efecto generado por la rotación de la tierra, conocido como efecto de Coriolis. Este proceso es muy importante en el océano y genera movimientos adicionales (Stommel, 1948); giros anticiclónicos en el hemisferio norte y giros ciclónicos en el hemisferio sur (Fig. 2). La masa de agua de la superficie es desplazada por el viento que sopla paralelo a la costa, el efecto de Coriolis desvía el agua en dirección contraria de la costa, lo que arrastra masas de agua cuya profundidad depende de la intensidad del viento. En el POT la fuerza del viento es mayor durante otoño e invierno, por lo que durante esta época se incrementa la cantidad de agua desplazada. La masa de agua superficial que se aleja de la costa, da como resultado una disminución en el nivel del agua, generando cambios de presión. El volumen de agua faltante en esta área es compensado por una masa de agua profunda que se desplaza a la superficie, a este fenómeno se le conoce como surgencia costera y es de gran importancia para las cadenas tróficas en los océanos (Wyrki, 1981). El agua fría llevada a la superficie influye en la profundidad de la termoclina e incrementa la producción primaria (Blanton *et al.*, 1987). Las zonas de mayor productividad se encuentran en los lugares donde se generan dichas surgencias (Jennings *et al.*, 2001). Las implicaciones para la distribución de las larvas se relacionan con una mayor cantidad de alimento, además de que las larvas son transportadas lejos de la costa y deben encontrar un mecanismo que los regrese a la zona costera, particularmente en el caso de los organismos arrecifales.

En los océanos, la temperatura se mantiene constante hasta cierta profundidad donde se encuentra la termoclina, en esta zona existe un límite que separa dos masas de agua de diferente densidad. Estas dos masas de agua presentan características distintas y se consideran como ambientes completamente diferentes para las larvas de peces, por lo que la mayor parte de los organismos se encuentran sobre la termoclina. La profundidad de la termoclina varía durante las diferentes estaciones del año, durante el invierno su ubicación es somera mientras que en verano es más profunda (Aceves-Medina *et al.*, 2009), por lo que

en verano el área donde se distribuyen las larvas es más amplia. Esto indica que en verano los procesos que determinan la distribución de los organismos juveniles son de mayor profundidad y son menos afectados por las corrientes superficiales. Los patrones estacionales influyen en los periodos de reproducción, ya que la variación en dichos periodos se relaciona con la intensidad de los procesos oceanográficos. Por ejemplo, la fuerza de la Corriente de California determina la profundidad de la termoclina en la costa, el incremento en su intensidad disminuye la profundidad de la termoclina. Una termoclina poco profunda crea ambientes fragmentados en la columna de agua, limitando el transporte de larvas con migración vertical, por lo que la variabilidad interanual en la fuerza de estos sistemas de corrientes a gran escala, podría dar lugar a la variabilidad en la dispersión (Pineda *et al.*, 2007).

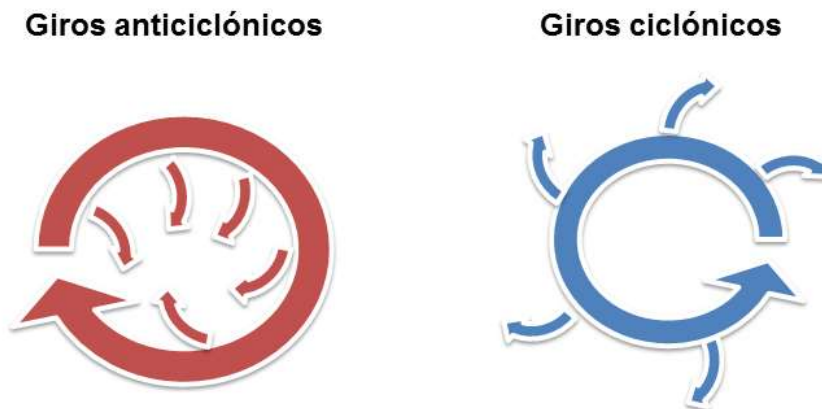


Figura 2. Esquema de los giros anticiclónicos y ciclónicos y la alteración causada por el efecto de Coriolis

Muchas especies de peces costeros de zonas tropicales se reproducen en las épocas del año en que las corrientes son menores, reduciendo el transporte de las larvas a grandes distancias de donde se originaron (Shulman, 1985; Johanness, 1978). El desove es también concentrado en las cercanías de giros oceánicos que favorecería el retorno de los juveniles a sus áreas de nacimiento (Bakun, 2006). En el Pacífico mexicano, particularmente en la región del istmo de Tehuantepec, los giros de mesoescala, han sido estudiados ampliamente y explicados desde el punto de vista meteorológico y oceanográfico (Chelton *et al.*, 2000; Trasviña y Andrade, 2002; Chelton *et al.*, 2004; Fiedler y Lavín, 2006; Kessler, 2006). Junto con las Ondas Tropicales de Inestabilidad (Tropical Instability Waves) conocidas como TIW por sus siglas en inglés, los giros de mesoescala son los principales componentes de la dinámica oceanográfica de la región. Estos procesos influyen en el

transporte de energía y calor en el océano, así como en las propiedades químicas y biológicas (Willett *et al.*, 2006). Las ráfagas de viento intensas conocidas comúnmente como Nortes ("Chorros de Viento Transistmicos"), están involucrados en la generación de giros oceánicos y se canalizan a través de tres brechas montañosas: el Chorro de Tehuantepec a través del Istmo de Tehuantepec, el Chorro de Papagayo sobre las tierras bajas centrales de Nicaragua, y el Chorro de Panamá a través del Istmo de Panamá (Fiedler y Lavín, 2006; Willett *et al.*, 2006) (Fig. 3). Desde otoño hasta el inicio de primavera, se registran de cuatro a 18 giros ciclónicos y anticiclónicos formados en la costa de la región ubicada entre el sur de México y Panamá (Willett *et al.*, 2006) (Fig. 4) temporada en que los "Chorros de Viento" ocurren en mayor frecuencia. Los "Chorros" de Tehuantepec se originan debido a la alta presión atmosférica que se presenta sobre la superficie del Golfo de México, causada por las tormentas de invierno que pasan a través de América del Norte (Chelton *et al.*, 2004). Cuando la presión atmosférica penetra lo suficientemente al sur, se generan los chorros de Papagayo y Panamá. Sin embargo, estos chorros son generalmente inducidos por variaciones del clima y son por lo regular, ajenos a las ráfagas de Tehuantepec (Chelton *et al.*, 2000). Un mecanismo adicional involucrado en la formación de giros, es la conservación de la vorticidad de la Contra Corriente Ecuatorial del Norte (CCEN) que genera inestabilidad en el oleaje y las corrientes costeras.

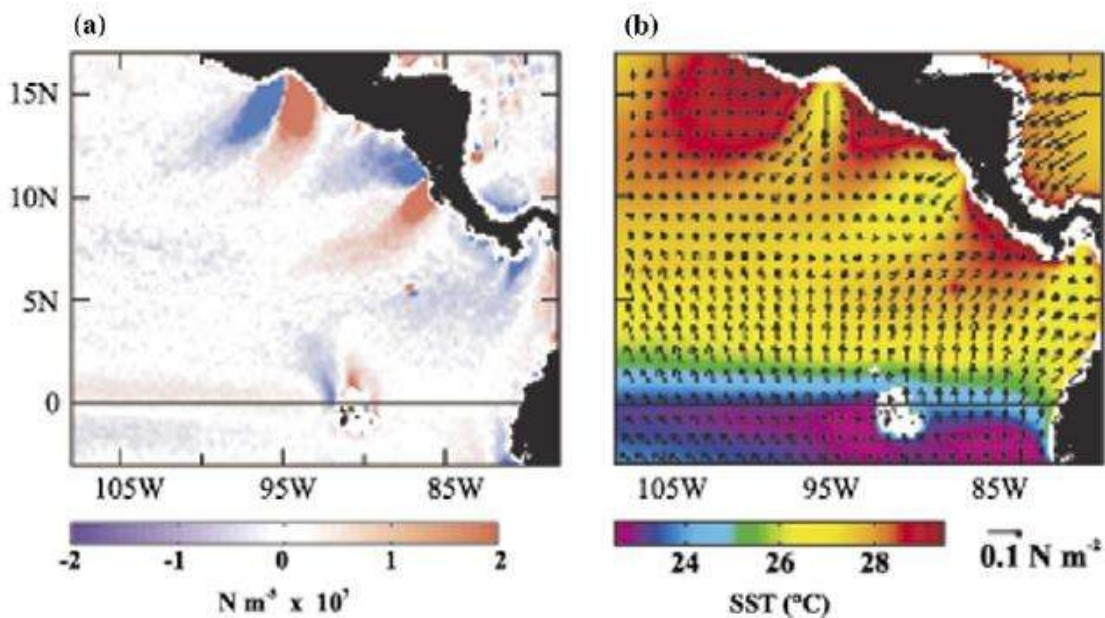


Figura 3. Promedio de cuatro años (Agosto de 1999 - Julio de 2003) de: (a) Curvaturas de la fuerza del viento y (b) temperatura de la superficie oceánica y vectores promedio de la fuerza del viento.  $\text{N m}^{-2} = \text{Newton metro}$ . Fuente: Chelton *et al.*, 2004.

Las observaciones con satélites de alta resolución, han sido utilizadas para estudiar las interacciones oceanográficas y meteorológicas en el Pacífico Oriental (Xie *et al.*, 2005; Willett *et al.*, 2006) permitiendo calcular la dimensiones de los giros que miden entre 180 y 500 km de diámetro y alcanzan profundidades en su centro de entre 60 y 145 m. El efecto de los giros sobre la producción primaria ha sido bien documentado por medio de observaciones directas e imágenes satelitales (Pennington *et al.*, 2006; Fernández-Álamo y Färber-Lorda, 2006). Se considera que el aumento de la producción de clorofila se asocia a los giros costeros. Los Golfos de Tehuantepec, Papagayo y Panamá destacan como zonas de alta fertilidad en contraste con las características de la región de la “Alberca Caliente” del Pacífico Oriental. Durante su formación, los giros concentran nutrientes y materia orgánica, transportándolos hasta 1000 km de distancia de la costa (Willett *et al.*, 2006). Por esta razón, en el Golfo de Tehuantepec, la variación espacial y temporal de la productividad primaria esta determina por la incidencia de los vientos locales estacionales (Fernández-Álamo y Färber-Lorda, 2006). Los giros (remolinos) oceánicos de mesoescala se originan por las interacciones atmosférico-oceanográficas, junto con las surgencias y afloramientos, son determinantes en el aumento de la producción primaria en esta zona (Xie *et al.*, 2005; Willett *et al.*, 2006; Pennington *et al.*, 2006; Fernández-Álamo y Färber-Lorda, 2006). El incremento de la productividad es aprovechado por gran cantidad de organismos resultando en grandes biomásas de zooplancton y crustáceos pelágicos (Fiedler, 2002). Evaluaciones en abundancia de zooplancton de diferentes grupos taxonómicos como medusas (Segura-Puertas, 1987), crustáceos (López-Cortes, 1990), poliquetos (Fernández-Álamo, 1987) e ictioplancton (Ayala-Duval *et al.*, 1998) han demostrado que la biomasa del zooplancton junto con la distribución y abundancia de peces, están ligadas a la presencia de fuertes vientos invernales y las condiciones particulares que generan estos vientos en las características oceanográficas. El desove en lugares cercanos a los giros es habitual en muchas especies, ya que los remolinos reducen la dispersión lejos de la costa y fomentan el posterior regreso a su punto de origen.

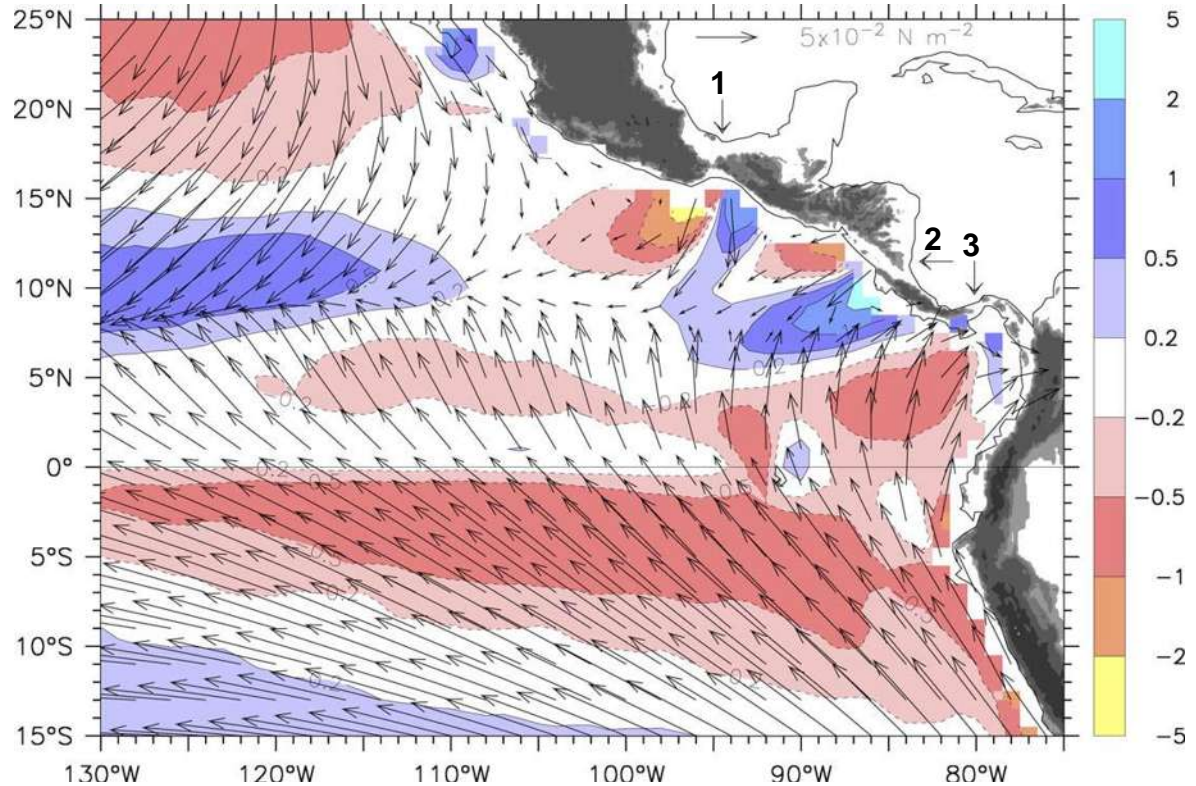


Figura 4. Valores promedio de la tensión del viento sobre la superficie del océano (flechas) y promedio de rotación de la tensión del viento (patrón de colores) durante agosto de 1999 a julio de 2002. Las áreas en azul indican rotación anticiclónica y en rojo, rotación ciclónica. Se indican con flechas las tres brechas montañosas de: (1) Tehuantepec, (2) Papagayo y (3) Panamá. Fuente: Kessler, 2006.

Las poblaciones ubicadas en diferentes latitudes presentan variación en sus estrategias reproductivas; en las zonas donde las surgencias ocurren en primavera y verano, las poblaciones de peces marinos tienden a reproducirse en invierno cuando el transporte es en dirección a la costa (Castro *et al.*, 2000). Sin embargo, la sincronización de los periodos de reproducción implica una disyuntiva de costo-beneficio. Los peces que se reproducen durante las surgencias en el verano, pueden beneficiar a las larvas al ubicarlas en un ambiente con una gran abundancia de alimento; sin embargo el régimen oceanográfico de las surgencias podría alejar demasiado a los peces de la costa. Además, como la abundancia de depredadores también se incrementa en primavera y verano, los huevos y larvas pueden estar sometidos a una mayor depredación durante esta temporada (Palma y Rosales, 1995). La reproducción durante el invierno representa beneficios como el transporte hacia la costa inducido por los giros y una menor depredación.



#### I.V. Especie de estudio: *Elacatinus puncticulatus*

Con cerca de 2000 especies descritas, la familia Gobiidae constituye la familia más numerosa de peces marinos (Nelson, 2006). Dentro de esta familia, *Elacatinus* es el género de peces arrecifales con mayor riqueza de especies en la región Neotropical (27 Spp.). *Elacatinus* se clasifica en dos subgéneros *Tigrigobius* y *Elacatinus* (Eschmeyer, 1998), el subgénero *Tigrigobius* contiene 12 especies descritas, cinco en el Océano Pacífico y siete en el Atlántico. El subgénero *Elacatinus* incluye 15 especies descritas, con una sola especie distribuida en el POT, *Elacatinus puncticulatus* (Ginsburg, 1938).

El gobio de cabeza roja: *Elacatinus puncticulatus*, se distribuye desde el centro del Golfo de California hasta Ecuador. Los adultos se encuentran restringidos a refugios formados en las rocas, sin embargo su fase larvaria es pelágica. No se reporta su presencia en las zonas donde se ubican las Brechas de Sinaloa y Centroamérica, aunque se han registrado larvas de gobios, por medio de cruceros de prospección ictioplanctónica, en la región de la Brecha de Sinaloa (Acal, 1991). Su distribución es estrictamente continental ya que no se registra su presencia en las islas del POT. Diagnóstico: Cuerpo alargado y cabeza redondeada. Un poro en la frente y dos poros en el preopérculo. Sin dientes en el paladar. Lengua con punta roma. Aleta dorsal VII + I espinas y 11 (10-12) radios. Aleta anal con I espina y 9-10 radios. Aleta pectoral con 20-23 radios. Aletas pélvicas fusionadas en un disco. Cola redondeada. Sin escamas. Esta especie difiere de todos sus congéneres en el Pacífico Oriental, por presentar dos escamas en la base de la aleta caudal, numerosos radios caudales bifurcados (12-15) y una franja negra en la cabeza (Fig. 5). *Elacatinus puncticulatus* habita en arrecifes rocosos y zonas pedregosas, frecuentemente se les encuentra en grietas, asociados con el erizo de mar *Eucidaris thouarsi* (Fig. 6). Se les encuentra comúnmente a profundidades de 1.5 a 6 metros. Es muy territorial y agresivo con otros individuos de su misma especie, excepto con su pareja. Durante el cortejo los machos se tornan oscuros y atraen a las hembras a sus escondites por medio de movimientos frecuentes y rápidos, posteriormente se produce el desove y los huevos son depositados en pequeñas grietas. La eclosión ocurre seis días después del desove, y la etapa larvaria dura de 35 a 40 días, durante este tiempo las larvas son dispersadas por las corrientes oceánicas, siendo transportadas a otros arrecifes donde deben establecerse al terminar esta fase.

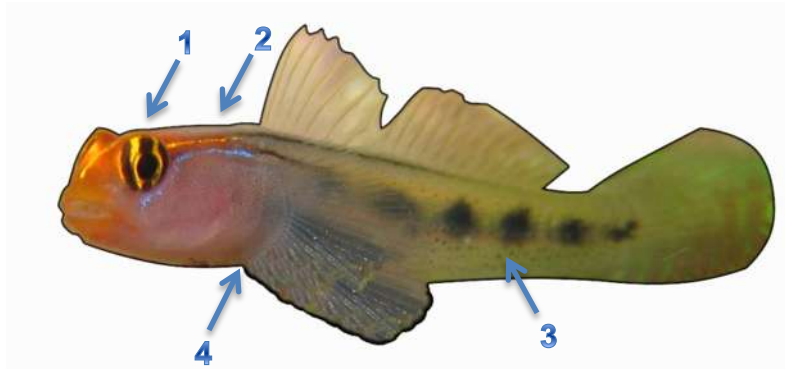


Figura 5. Características distintivas de *Elacatinus puncticulatus*: cabeza de color rojo o translúcida con una franja rojo brillante detrás de cada ojo (1), las dos líneas rojas que van desde la boca hacia atrás de los ojos (2), una fila de 8 puntos o manchas oscuras a lo largo del costado del cuerpo (3) y una banda ancha interna de color negro sobre la cavidad abdominal (4).



Figura 6. *Elacatinus puncticulatus* cerca de espinas del erizo *Eucidaris thouars*. Localidad de "La Blanca" en Oaxaca, México.

Las larvas son planctotróficas, alimentándose en la columna de agua de diversos grupos de invertebrados, larvas de otros peces y nauplios de copépodos. En su etapa adulta se alimentan principalmente de invertebrados bénticos (Viesca-Lobatón *et al.*, 2008). Se desconoce la época exacta de reproducción, sin embargo durante este estudio se observaron y recolectaron machos en fase reproductiva a finales del verano en inmersiones realizadas en la costa de Oaxaca (septiembre, 2012).

### I.VI. Análisis Filogeográfico

Las características biológicas y ámbito de distribución, hacen de *Elacatinus puncticulatus* una especie ideal para evaluar la efectividad de las barreras geográficas o inferir la existencia de mecanismos adicionales que funcionan como limitantes para la dispersión de los peces arrecifales. En este sentido, los estudios filogeográficos por medio de secuencias de ADN resultan útiles para evaluar la distribución espacio-temporal de los linajes genealógicos, siendo capaces de identificar la estructura genética de las poblaciones o en caso contrario, el flujo génico. Incluso, cuando los modelos genéticos son evaluados a la par de datos oceanográficos y biológicos, pueden aportar información de los mecanismos que están influyendo en dicha estructura o conectividad de las poblaciones (Galindo *et al.*, 2010). La filogeografía considera los componentes históricos de la distribución de linajes de genes en el tiempo y el espacio. Avise (2000) define a la filogeografía como “el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas”. Los estudios filogeográficos permiten evaluar procesos ecológicos y determinar la historia evolutiva de un grupo de organismos, además de que sus aplicaciones son útiles para entender como se ha generado la diversidad de ciertas regiones o grupos, con implicaciones para la biología de la conservación y la taxonomía (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). De igual forma son fundamentales para las pesquerías, especialmente en los casos en que es necesario establecer zonas marinas protegidas que incluyan ecosistemas críticos para el reclutamiento de especies de importancia comercial (Cowen y Sponaugle, 2009).

En estudios filogeográficos, las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) son las que se utilizan en mayor medida, ya que su herencia es casi exclusivamente materna, no presentan recombinación y su tasa de mutación es alta (Avise *et al.*, 1987; Hellberg *et al.*,

2002). El ADNmt se hereda de forma materna, está formado por una cadena doble circular y cada organelo cuenta con cinco a 10 copias. Está conformado por un total de 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia), además de una región conocida, en vertebrados y equinodermos, como región control, que controla la replicación y transcripción en la molécula (Brown, 1985; Wainscoat, 1987; Lunt *et al.*, 1998).

El gen mitocondrial Citocromo b (Cyt b) ha sido frecuentemente utilizado en análisis filogeográficos (Meyer, 1994). El gen Cyt b se transcribe en la molécula de ARN mensajero mitocondrial 11, cuyo número de nucleótidos es de 1140, y es parte del complejo III de la cadena de electrones de la membrana interna. Es la única proteína mitocondrial que no interacciona con ninguna proteína de origen nuclear. La Región Control (RC), interviene en la replicación y transcripción en la molécula y suele tener una tasa excepcionalmente alta de sustitución y de polimorfismo en muchos taxones, presenta un alto nivel de variación en comparación con otras secuencias mitocondriales (Arif y Khan, 2009). Las secuencias de Cyt b y RC han sido ampliamente usadas como marcadores moleculares debido a que cuentan con una mejor resolución para revelar diferencias evolutivas dentro o entre especies cercanamente relacionadas (Taylor y Hellberg, 2005). Su alto nivel de variación permite evaluar los niveles de estructura genética en especies con amplia distribución.

Sin embargo, el uso exclusivo del ADNmt implica riesgos, debido a que involucra un solo locus que podría estar ligado a selección o presentar introgresión. Debido a las características hereditarias del ADNmt, las diferencias etológicas o ecológicas entre hembras y machos pueden influir en la interpretación de los resultados (Avise, 2008; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Por ello, frecuentemente se utilizan en forma combinada, genealogías obtenidas de datos de ADNmt y ADN nuclear (ADNn). El uso de genes nucleares también genera complicaciones relacionadas con la recombinación, su tasa de mutación relativamente lenta, así como el hecho de que cada locus muestre historias evolutivas independientes (Zhang *et al.*, 2005). Realizar reconstrucciones y comparaciones de más de un gen, es una de las principales aproximaciones de análisis para enfrentar este problema. Al encontrar congruencia en las historias filogeográficas analizadas, existe una mayor probabilidad de evaluar la filogeografía de la especie y no la del gen (Avise, 2000).

La rodopsina (Rho) es un gen nuclear de copia única, utilizado ampliamente en reconstrucciones filogenéticas (Bowmaker 1998; Sakmar 1998; Townson *et al.*, 1998). La Rho codifica un receptor de siete dominios transmembranales de la proteína G que conforman el primer paso en la cascada de transducción visual en los fotorreceptores de los ojos (Nathans 1992). Existen muy pocos casos en los que la Rho se encuentra en más de

una copia, por ejemplo, en animales poliploides, como *Cyprinus carpio* (Larhammar y Risinger 1994).

Los intrones de genes nucleares, proporcionan una alternativa al uso de secuencias codificantes como marcadores genéticos. A diferencia del ADN codificante, los intrones nucleares no están restringidos por las limitaciones funcionales impuestas a regiones que sí codifican. El gen de la proteína ribosomal S7 consiste en siete exones y seis intrones, su extensión varía considerablemente. El primer intrón ha sido utilizado con éxito en muchos estudios sistemáticos y análisis filogeográficos en peces teleósteos (Bernardi y Lape, 2005; Chakrabarty, 2006; Morrison *et al.*, 2006).

En conjunto, la comparación de secuencias de ADNmt y ADNn de diferentes poblaciones de *Elacatinus puncticulatus* distribuidas a lo largo del POT, permitirá identificar barreras entre poblaciones y evaluar la influencia que pueden tener en la diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones. Así mismo, los resultados obtenidos permitirán inferir hipótesis sobre la historia evolutiva de la especie.

## II. HIPÓTESIS

- Las poblaciones de *Elacatinus puncticulatus* distribuidas a través de la costa del Pacífico Oriental Tropical, presentan estructuración genética influenciada por la presencia de barreras generadas por procesos oceanográficos y disponibilidad de hábitat adecuado.

## III. OBJETIVOS

### III.I. Objetivo general

- Evaluar la influencia de las barreras oceánico-geográficas en los niveles de diferenciación y estructuración genética de poblaciones de *Elacatinus puncticulatus* distribuidas en la costa del Pacífico Oriental Tropical.

### III.II. Objetivos Particulares

- Estimar la diversidad genética en poblaciones de *Elacatinus puncticulatus*.
- Establecer la historia filogeográfica de *E. puncticulatus*.
- Inferir los procesos históricos que explican la estructura filogeográfica de esta especie.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### IV.I. Poblaciones muestreadas.

Se realizaron muestreos en arrecifes rocosos en 23 localidades de cuatro países a lo largo de la costa POT (Fig. 7, Tabla 1). Los sitios de recolecta fueron seleccionados con el objetivo de incluir localidades ubicadas en las tres provincias biogeográficas divididas por las barreras evaluadas. Los individuos fueron agrupados en poblaciones putativas con base en su ubicación geográfica y delimitación política. La recolecta se realizó mediante inmersiones con equipo de buceo autónomo (SCUBA). Una vez ubicados los peces en sus refugios, éstos fueron inmovilizados aplicando un cantidad pequeña de anestésico (eugenol diluido al 5% en etanol) con la ayuda de una bomba de aspersión. Después de 2 a 5 minutos, se capturaron con redes de mano y jeringas de succión (Torres-Hernández, 2011).

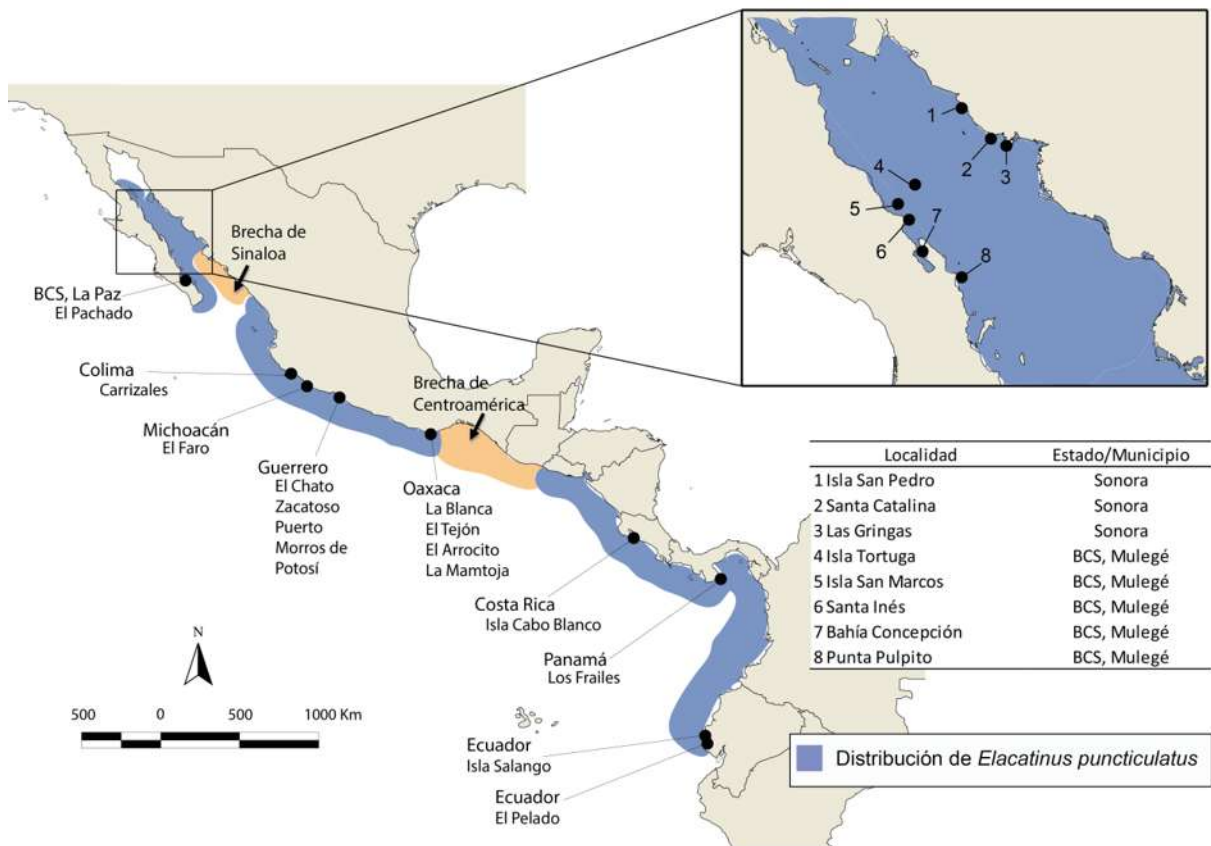


Figura 7. Ubicación y localidad de los sitios de recolecta.

Se tomaron porciones de tejido de los organismos recolectados, preservándolas en viales con etanol grado analítico (95%); los viales etiquetados se almacenaron a  $-76^{\circ}\text{C}$ . Los organismos fueron fijados en formaldehído al 5% y se preservaron en alcohol etílico al 70%. Los ejemplares se depositaron en la Colección Ictiológica del Laboratorio de Biología Acuática de la UMSNH (Registro: PEC-227-07-09).

Tabla 1. Ubicación geográfica y regionalización de las localidades muestreadas

Localidad	Coordenadas	Población	Provincia
Isla San Pedro	28°15'48"N, 111°26'5"O		
Sta. Catalina	27°55'50"N, 111° 3'37"O	Sonora	
Las Gringas	27°53'8"N, 110°57'18"O		
Isla Tortuga	27°25'59"N, 111°52'37"O		De Cortés
Isla San Marcos	27°12'35"N, 112°2'33"O		
Santa Inés	27°1'59"N, 111°54'49"O	Baja California Sur (Mulegé)	
Bahía Concepción	26°53'39"N, 111°49'26"O		
Punta Pulpito	26°26'52"N, 111°25'37"O		
El Pachado	24°28'55"N, 110°23'3"O	Baja California Sur (La Paz)	
Carrizales	19° 5'48"N, 104°26'21"O	Colima	
El Faro	18°21'9"N, 103°31'19"O	Michoacán	
El Zacatoso	17°39'14"N, 101°37'21"O		
El Puerto	17°37'11"N, 101°33'53"O		
El Chato	17°33'57"N, 101°31'29"O	Guerrero	Mexicana
Morros de Potosí	17°31'50"N, 101°29'39"O		
La Blanca	15°42'48"N, 96°12'1"O		
El Tejón	15°43'18"N, 96°55'7"O		
El Arrocito	15°44'56"N, 96° 5'45"O	Oaxaca	
La Mamtoja	15°38'60"N, 96° 29'46"O		
Isla Cabo Blanco	9°32'39"N, 85°6'50"O	Costa Rica	
Los Frailes	7°20'52"N, 80°8'12"O	Panamá	Panámica
Isla Salango	1°35'46"S, 80°51'60"O		
El Pelado	3° 5'33"S, 80°28'33"O	Ecuador	



#### IV.II. Amplificación y secuenciación.

La extracción del ADN se realizó mediante el método estándar del fenol – cloroformo de Sambrook *et al.* (1989). La amplificación de fragmentos específicos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). La técnica de PCR consiste en sintetizar numerosas reproducciones de fragmentos de ADN. Se utiliza una polimerasa que soporta temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* (*taq* polimerasa) que habita en zonas con altas temperaturas (79°C a 85°C). La reacción de PCR simula la síntesis de ADN mediante la mezcla del ADN del organismo objetivo, los primers específicos para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs) y las condiciones necesarias para que la enzima se desempeñe adecuadamente mediante determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl<sub>2</sub>.

El gen *Cytb*, se amplificó usando los primers GLUDG, CB2 (Palumbi, 1996), LA y HA (Dowling *et al.*, 2002). Para la RC se usaron los primers CRL15980, CRH370 (Palumbi, 1996), RCA y RCE (Lee *et al.*, 1995). Además, se amplificó el gen nuclear de la Rho mediante los primers RH193 y RH1073 (Chen *et al.*, 2003) y el intrón 1 de la proteína ribosomal S7 con los primers S71F y S72R (Yang *et al.*, 2005) (Tabla 2).

Tabla 2. Nombre del fragmento amplificado, código y secuencia de los primers.

	Primer	Secuencia	
Mitochondrial	GLUDG	5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3'	
	Citocromo b	CB2	5'-CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'
		LA	5'-GTGACTTGAAAAACCACCGTTG-3'
		HA	5'-CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC-3'
		CRL15980	5'-CTACCTCCAACCTCCCAAAGC-3'
	Región Control	CRH370	5'-GGAACCAAATGCCAGGAAATAG-3'
		RCA	5'-TTCCA CCTCT AACTC CCAA GCTAG-3'
		RCE	5'-CCTGA AGTAG GAACC AGATG-3'
Nuclear		Rodopsina	RH193
	RH1073		5'-CCRCAGCACARCGTGGTGATCATG-3'
	Intrón 1 S7	S71F	5'-CCAAAGGAGGTGCCTGTTCA-3'
		S72R	5'-TTGAGGTGAGTCAGAATGTTGTTTC-3'

Se realizaron reacciones de 25  $\mu$ L con una concentración final de 0.4  $\mu$ M de cada primer, 0.2mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación del Cytb y la RC se realizó con las siguientes condiciones: 94°C por tres minutos (min), para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (seg), 52.4°C por 45 seg y 72°C por 60 seg. Las condiciones para el gen Rho y S7 fueron: 94°C por 4 min, 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 45 seg y 72°C por 45 seg seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 45 seg y 72°C por 45 seg. Los productos de PCR fueron revisados en geles de agarosa al 1.5% y los productos con amplificación positiva fueron enviados para su secuenciación al High Throughput Genomics Center, en Seattle, WA, EUA.

#### IV.III. Análisis de datos moleculares

##### Cytb

*Estadísticos descriptivos.* Los cromatogramas fueron examinados y alineados manualmente usando el software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Todas las diferencias entre haplotipos fueron resultado de sustituciones, no se registraron indels. Para identificar el modelo evolutivo que se ajustaba en mayor medida a las secuencias, se utilizó el programa jMODELTEST v3.7 (Posada, 2008). El método de elección fue el Criterio de Información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés). El modelo seleccionado fue TRN (Tamura y Nei, 1993) + Gamma (tasa de variación entre sitios con distribución tipo Gamma) (Tabla 3).

|Tabla 3. Modelo evolutivo y parámetros estimados para Cytb por el criterio de información Akaike AIC.

Modelo Evolutivo	lnL	Frecuencia de bases nucleotídicas empíricas	Modelo de sustitución tasa Ti/Tv	Parámetro: Forma de la distribución Gamma
TrN+G	-3095.59	A=0.2322 C=0.3157 G=0.1516 T=0.3005	Ti variable/Tv uniforme	0.114

Por medio del programa DnaSP v 4.0. (Rozas *et al.*, 2003) se identificaron los haplotipos únicos. Utilizando ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) se calcularon el número de haplotipos (Hn) y los polimorfismos de ADN como la diversidad haplotípica ( $H_d$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ; Nei, 1987), el número promedio de diferencias nucleotídicas por pares ( $k$ ; Tajima, 1983) y el número de sitios polimórficos (S). Se comparó la diversidad haplotípica entre poblaciones, mediante curvas de rarefacción de haplotipos generadas con el programa EstimateS 9.1.0. (Colwell, 1999). Las curvas fueron calculadas con intervalos de confianza incondicionales del 95% usando las fórmulas de Colwell *et al.* (2004, 2012). La rarefacción proporciona un esquema de re-muestreo que selecciona individuos aleatoriamente (generalmente sin reemplazo) hasta que se ha acumulado el total de individuos de la muestra de referencia.

Para evaluar la existencia de desviaciones del modelo esperado de neutralidad se calcularon las pruebas de neutralidad de D de Tajima (Tajima, 1989) y F de Fu (Fu, 1996). Estos estadísticos comparan los valores de  $\pi$  y  $\theta$ , la distribución de las mutaciones en las ramas de un árbol y el número de haplotipos observados para determinado valor de  $\pi$ . El valor de  $\theta$  es calculado con la ecuación  $\theta = 4N_e\mu$  (Kimura, 1968). Donde  $N_e$  es el tamaño efectivo poblacional y  $\mu$  es la tasa de mutación. La determinación exacta de  $N_e$  y  $\mu$  es complicada, por lo que  $\theta$  se estima de manera indirecta utilizando el número total de sitios segregativos en un grupo de secuencias, de esta manera  $\theta = K/a$ , donde K es el número total de sitios segregativos en una muestra de secuencias dada y  $a = 1 + 1/2 + \dots + 1/n-1$  ( $n$  = número de secuencias en la muestra; Watterson, 1975; Tajima, 1983).

*Métodos Filogenéticos y Redes de Haplotipos.* Se realizó una reconstrucción filogenética obtenida con el método del vecino más cercano (Neighbor Joining, NJ), basándose en distancias de máxima verosimilitud compuesta. Los valores de bootstrap se obtuvieron después de 1000 repeticiones. Como grupos externos se utilizaron secuencias de las especies estrechamente relacionadas *Elacatinus saucrus* y *E. evelynae*, obtenidas de la base de datos GenBank (Benson *et al.*, 2010). Adicionalmente, se realizó una reconstrucción filogenética mediante el método estadístico de Máxima Verosimilitud usando el modelo de sustitución de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) ajustando los parámetros de acuerdo al modelo evolutivo obtenido con jModelTest. Los valores de bootstrap se obtuvieron después de 1000 repeticiones. Para ambos análisis se utilizó el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Se construyeron redes de haplotipos no enraizadas mediante Máxima Parsimonia, utilizando el software TCS (Phylogenetic Network Estimation Using Statistical Parsimony). Los métodos de construcción de redes de Máxima Parsimonia establecen un criterio estadístico (parsimonia estadística) por el que cada haplotipo que no excede un límite de parsimonia, se une a una sola red dejando en redes sin conectar, haplotipos que sobrepasan los límites estadísticos determinados. Este procedimiento divide el total de la diversidad genética inferida, en unidades significativamente diferentes, contrario a algoritmos que tienden a unir en un sola red a cada haplotipo independientemente de la cantidad de diferencias nucleotídicas encontradas entre ellos (Clement *et al.*, 2000).

*Distancias y Estructura Genética.* Se estimaron las distancias genéticas  $p$  ( $p$ -distance) para evaluar el grado de divergencia entre poblaciones. La distancia  $p$  es la medida de distancia más simple entre dos secuencias, la cual es la proporción de sitios que difieren entre dos secuencias. La distancia  $p$  es útil cuando el número de sustituciones por sitio es muy bajo (Nei y Zhang, 2006). Además se estimó el estadístico  $F_{ST}$  (Wright, 1931), el cual permite obtener el índice de diferenciación entre pares de poblaciones. Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), para estimar la variación genética entre y dentro de las poblaciones agrupadas en diferentes arreglos con el objetivo de encontrar la máxima variación (1000 permutaciones). Adicionalmente, se desarrolló un Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA) (Dupanloup *et al.*, 2002), el cual define grupos de poblaciones con base en su cercanía geográfica y su similitud genética, pero maximizando la diferenciación entre grupos. De esta manera, es posible inferir la existencia de barreras geográficas entre estos grupos. Este método utiliza un algoritmo de simulaciones anidadas para maximizar la proporción de la varianza genética total, con respecto a las diferencias entre los grupos de poblaciones. A diferencia del AMOVA, en el SAMOVA no se designan agrupamientos *a priori*, únicamente se establece el número variable de agrupamientos. Estos análisis se realizaron mediante los programas ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, *op. cit.*) y SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, *op. cit.*).

*Demografía histórica y tiempos de divergencia.* Se analizó la distribución de las diferencias por pares (Distribuciones Mismatch). Se dividió el total de secuencias en tres grupos: (1) todas las poblaciones de México, (2) las de Panamá y Costa Rica y (3) los individuos de Ecuador. Este análisis se realizó mediante el programa DNAsp, el cual muestra un gráfico que representa los valores esperados y observados de la constancia y expansión de las

poblaciones. DNAsp estima los estadísticos “Raggedness  $r$ ” (Harpending, 1993) y  $R^2$  (Ramos-Onsis y Rozas, 2002) que cuantifican el ajuste de la distribución de las diferencias por pares, distinguiendo entre poblaciones de tamaño constante y en crecimiento. La estimación de los estadísticos  $r$  y  $R^2$  se fundamenta en que los números esperados de conjuntos de un solo elemento, después de un evento de crecimiento poblacional reciente, serían de  $k/2$ . Valores bajos de  $r$  y  $R^2$  se presentan en modelos de crecimiento poblacional.

Para estimar los tiempos de divergencia de los clados identificados, se utilizaron análisis bayesianos de coalescencia con el software BEAST v1.6.2 (Drummond y Rambaut, 2007) bajo el modelo de evolución nucleotídica estimado anteriormente y bajo el método de Bayesian Skyline Plot (BSP, Drummond *et al.*, 2005). Para ello se utilizó un reloj molecular relajado, calibrado con la tasa de mutación estimada para gobios, 1.93-2.7% por millón de años ( $9.65 \cdot 10^{-9}$ - $1.35 \cdot 10^{-8}$  sustitución/linaje/sitio/año) (Rocha *et al.*, 2005). Para dicho análisis se utilizaron 80,000,000 pasos para la longitud de las cadenas, muestreando cada 1000 topologías. Después de revisar los valores posteriores de los “priors” mediante los Tamaños Efectivos de Muestra (Effective Size Sample, ESS)  $\geq 200$ , se descartó el 10% de las topologías para la reconstrucción del árbol consenso. Para ello, se seleccionaron las topologías con valores de soporte mayores al 50% (Posterior Probability Limit=0.05) con límites de confianza mayores o iguales al 95% (HPD $\geq$ 95%). El algoritmo principal implementado en BEAST es Metropolis- Hastings (Metropolis *et al.*, 1953; Hastings 1970) mediante MCMC.

### **RC y ADN Nuclear**

*Estadísticos descriptivos.* Los cromatogramas fueron examinados y alineados manualmente mediante MEGA 5. No se registró la presencia de indels en la RC y Rho, en el caso de S7 se registró una deleción en el sitio 715 que fue considerada como un quinto estado. Se identificaron los haplotipos únicos con DnaSP v 4.0. y se calcularon el número de haplotipos ( $H_n$ ), la diversidad haplotípica ( $H_d$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), el número promedio de diferencias nucleotídicas por pares ( $k$ ) y el número de sitios polimórficos ( $S$ ), utilizando ARLEQUIN 3.5.

*Métodos Filogenéticos y Redes de Haplotipos.* El método de reconstrucción filogenética para la RC, Rho y S7 fue el de NJ, basándose en distancias de máxima verosimilitud compuesta. Los valores de bootstrap se obtuvieron después de 1000 repeticiones. Como grupos externos se utilizaron secuencias de la base de datos GenBank; *Elacatinus evelynae* para la

RC y *Elacatinus saucrus*, para Rho. En el caso de S7 la secuencia del grupo externo *E. inornatus*, fue amplificada en el laboratorio debido a que no se encontraron secuencias de este marcador para el género *Elacatinus* en el Gen Bank. Se reconstruyeron redes de haplotipos no enraizadas con métodos de máxima parsimonia implementados en el programa TCS.

*Distancias Genéticas.* Se estimaron las distancias genéticas p mediante el modelo de distancias pareadas utilizando MEGA 5.

## V. RESULTADOS

### V.I. Muestras obtenidas

Se recolectaron 140 individuos de *Elacatinus puncticulatus* en 23 localidades del POT.

### V.II. ADN Mitocondrial

#### Cytb

*Estadísticos descriptivos.* Se secuenciaron 1140 pb del gen Cytb de 117 individuos de *Elacatinus puncticulatus*, de los cuales se obtuvieron 65 haplotipos. El número de individuos (N), el número de haplotipos (Hn), la diversidad haplotípica ( $H_d$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), el número promedio de diferencias nucleótidas por pares ( $k$ ) y el número de sitios polimórficos (S) se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Índices de diversidad genética de Cytb para *Elacatinus puncticulatus*

Provincia	Población	N	Hn	$H_d \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$	$k$	S
De Cortés	Sonora	14	7	$0.692 \pm 0.137$	$0.00098 \pm 0.0003$	1.121	7
	B. C. S. (Mulegé)	9	5	$0.833 \pm 0.098$	$0.00107 \pm 0.0002$	1.222	4
	B. C. S. (La Paz)	9	2	$0.389 \pm 0.164$	$0.00034 \pm 0.0001$	0.389	1
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>11</b>	<b><math>0.681 \pm 0.091</math></b>	<b><math>0.00091 \pm 0.0002</math></b>	<b>1.032</b>	<b>10</b>
Mexicana	Colima	6	6	$1.0 \pm 0.096$	$0.00316 \pm 0.0005$	3.6	9
	Michoacán	4	4	$1.0 \pm 0.177$	$0.00234 \pm 0.0008$	2.667	5
	Guerrero	24	23	$0.996 \pm 0.013$	$0.00405 \pm 0.0004$	4.612	32
	Oaxaca	18	11	$0.928 \pm 0.040$	$0.00251 \pm 0.0004$	2.856	15
	<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>36</b>	<b><math>0.972 \pm 0.013</math></b>	<b><math>0.00336 \pm 0.0003</math></b>	<b>3.827</b>	<b>44</b>
Panámica	Panamá	8	6	$0.893 \pm 0.111$	$0.00132 \pm 0.0003$	1.5	6
	Costa Rica	10	6	$0.778 \pm 0.137$	$0.00101 \pm 0.0003$	1.156	5
	Ecuador	15	8	$0.790 \pm 0.105$	$0.00092 \pm 0.0002$	1.048	7
	<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>19</b>	<b><math>0.905 \pm 0.036</math></b>	<b><math>0.00439 \pm 0.0002</math></b>	<b>5.009</b>	<b>22</b>
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>65</b>	<b><math>0.959 \pm 0.011</math></b>	<b><math>0.01118 \pm 0.0008</math></b>	<b>12.751</b>	<b>86</b>	

N=número de individuos, Hn=número de haplotipos,  $H_d$ =diversidad haplotípica,  $\pi$ =diversidad nucleotídica,  $k$ =promedio de diferencias nucleótidas por pares, S=número de sitios polimórficos.

Entre provincias, la Mexicana mostró los valores más altos de  $H_d$  (0.972) mientras que la Panámica mostró los valores más altos de  $\pi$  (0.00439) y  $k$  (5.009). Las poblaciones pertenecientes a la Provincia Mexicana son las que mostraron los valores más altos de  $H_d$  (0.93-1.0),  $\pi$  (0.0023-0.004) y  $k$  (2.66-4.61). En cambio, las poblaciones de la Provincia de Cortés mostraron los valores más bajos de  $H_d$  (0.389-0.833).

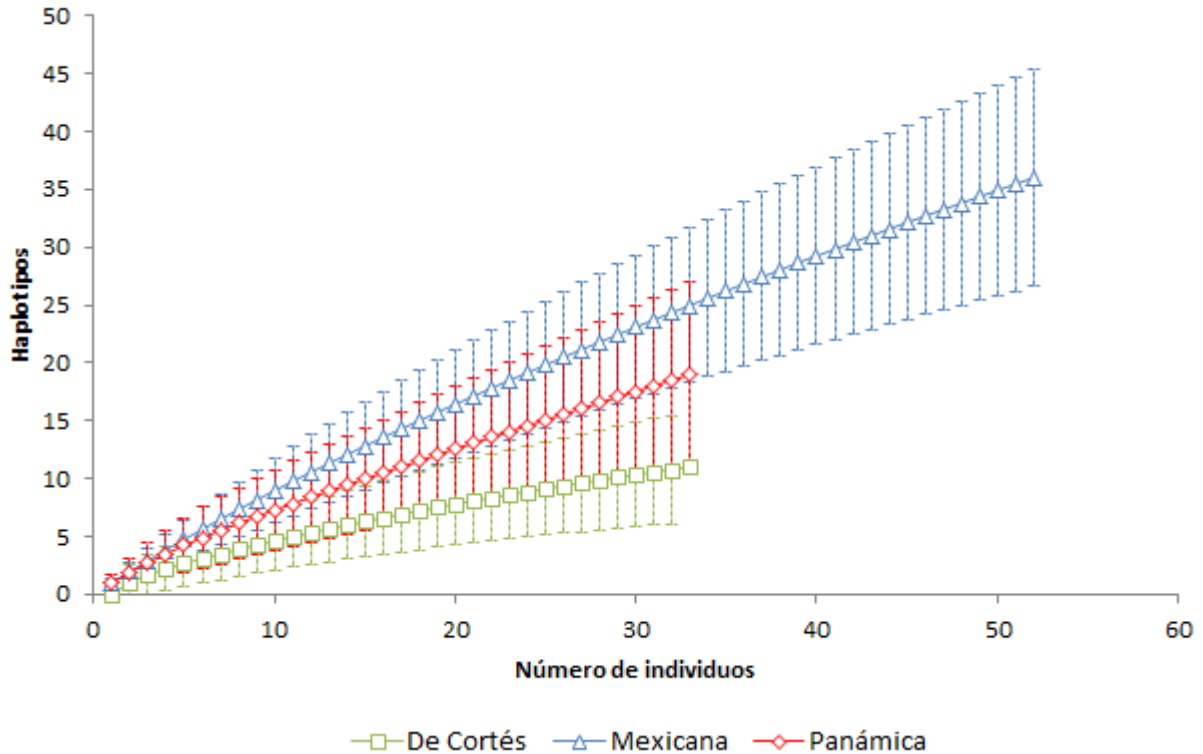


Figura 8. Curvas de rarefacción de haplotipos de las tres provincias del POT. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza del 95%.

Las curvas de rarefacción mostraron que existe una mayor diversidad haplotípica para la Provincia Mexicana en comparación con la de Cortés. No fue posible realizar una comparación entre la Provincia de Cortés y la Panámica ni entre la Provincia Panámica y la Mexicana debido a que existe un traslape entre los intervalos de confianza de las curvas. De las tres provincias, la de Cortés, es la única que muestra valores que se acercan a la asíntota (Fig. 8). Los amplios intervalos de confianza de las provincias Mexicana y Panámica, reflejan la inestabilidad de la diversidad de haplotipos, implicada en la dificultad de estimar la probabilidad de encontrar haplotipos nuevos por cada secuencia adicional.



Para el total de individuos la D de Tajima fue negativa y no significativa (-0.674  $p=0.236$ ) mientras que la F de Fu, fue negativa y significativa (-24.17  $p=0.000$ ) (Tabla 5). Por provincias, únicamente la Panámica no mostró valores negativos significativos en ambos estadísticos. Por poblaciones, los valores fueron en su mayoría negativos, excepto para la población de La Paz (D: 0.477  $p=0.406$ ; F: 0.156  $p=0.737$ ). Las poblaciones de Guerrero, Panamá y Ecuador fueron las únicas con valores significativos negativos en ambas pruebas. No se encontraron valores positivos significativos en ninguna de las pruebas.

Tabla 5. Pruebas de neutralidad de las secuencias de Cytb. Los números en negritas indican valores de  $p$  menores a 0.05

Población	F de Fu	D de Tajima
Sonora	-4.070 $p=0.242$	<b>-1.811 <math>p=0.023</math></b>
B. C. S. (Mulegé)	<b>-1.995 <math>p=0.022</math></b>	-0.689 $p=0.287$
B. C. S. (La Paz)	0.477 $p=0.406$	0.156 $p=0.737$
Prov. de Cortés	<b>-8.152 <math>p=0.000</math></b>	<b>-1.825 <math>p=0.0140</math></b>
Colima	<b>-2.855 <math>p=0.012</math></b>	-0.516 $p=0.367$
Michoacán	-1.414 $p=0.073$	-0.212 $p=0.558$
Guerrero	<b>-23.107 <math>p=0.000</math></b>	<b>-1.748 <math>p=0.021</math></b>
Oaxaca	<b>-4.719 <math>p=0.007</math></b>	-1.308 $p=0.102$
Prov. Mexicana	<b>-25.977 <math>p=0.000</math></b>	<b>-2.068 <math>p=0.004</math></b>
Costa Rica	<b>-3.412 <math>p=0.002</math></b>	-1.388 $p=0.106$
Panamá	<b>-3.443 <math>p=0.002</math></b>	<b>-1.670 <math>p=0.023</math></b>
Ecuador	<b>-5.822 <math>p=0.000</math></b>	<b>-1.849 <math>p=0.014</math></b>
Prov. Panámica	<b>-7.108 <math>p=0.005</math></b>	-0.262 $p=0.444$
Total	<b>-24.173 <math>p=0.000</math></b>	-0.674 $p=0.236$

*Métodos Filogenéticos y Redes de Haplotipos.* El análisis filogenético de NJ realizado con 65 haplotipos de 117 secuencias de Cytb (Fig. 9), identificó dos clados principales. En un clado se agruparon todos los individuos de la Provincia de Cortés y Mexicana y el otro incluyó a los individuos de la Provincia Panámica. No se identificó un patrón claro que definiera las relaciones entre los individuos de la Provincia de Cortés y Mexicana, sin embargo se observan secuencias de individuos pertenecientes a la Provincia Mexicana que se relacionan en mayor medida a la Provincia de Cortés. Se identificó además una subdivisión dentro del clado de la Provincia Panámica; en un subgrupo se conjuntaron los individuos de Ecuador y

en otro, los de Costa Rica y Panamá (Centroamérica). La inferencia filogenética por Máxima Verosimilitud (Fig. 10) identificó las mismas relaciones entre haplotipos que las mostradas por la reconstrucción de NJ. En esta reconstrucción también se utilizaron solamente los 65 haplotipos únicos. Los valores de soporte en los nodos de los dos clados principales y en la subdivisión del clado de la Provincia Panámica fueron de 99 en ambos análisis.

La red de haplotipos (Fig. 11) identificó dos haplogrupos separados por 22 diferencias nucleotídicas, ocho diferencias por arriba del límite de confianza, estimado para separar haplogrupos en el análisis por TCS. Uno de los haplogrupos está conformado por 46 haplotipos (n=84 individuos) de las provincias de Cortés y Mexicana y el otro por 19 haplotipos (n=33 individuos) que corresponden a la Provincia Panámica. Dos haplotipos que pertenecen a las poblaciones de Guerrero y Ecuador conectan a estos dos haplogrupos. Entre ambos haplogrupos, no se encontraron haplotipos compartidos. A su vez, el haplogrupo de la Provincia Panámica está subdividido, 11 haplotipos de Costa Rica y Panamá conforman un subgrupo separado por seis pasos mutacionales de un segundo subgrupo compuesto por ocho haplotipos de Ecuador. Entre las Provincias Mexicana y de Cortés se identifican haplotipos compartidos, similar al patrón observado en el árbol filogenético. Además, existen haplotipos que corresponden a las poblaciones de Colima, Michoacán y Guerrero que presentan una mayor relación con haplotipos de la Provincia de Cortés. De manera contraria, no se encontraron haplotipos en la Provincia de Cortés, relacionados con haplotipos de la Provincia Mexicana. La lista completa de haplotipos y la población a la que pertenecen se detallan en el Apéndice 1.

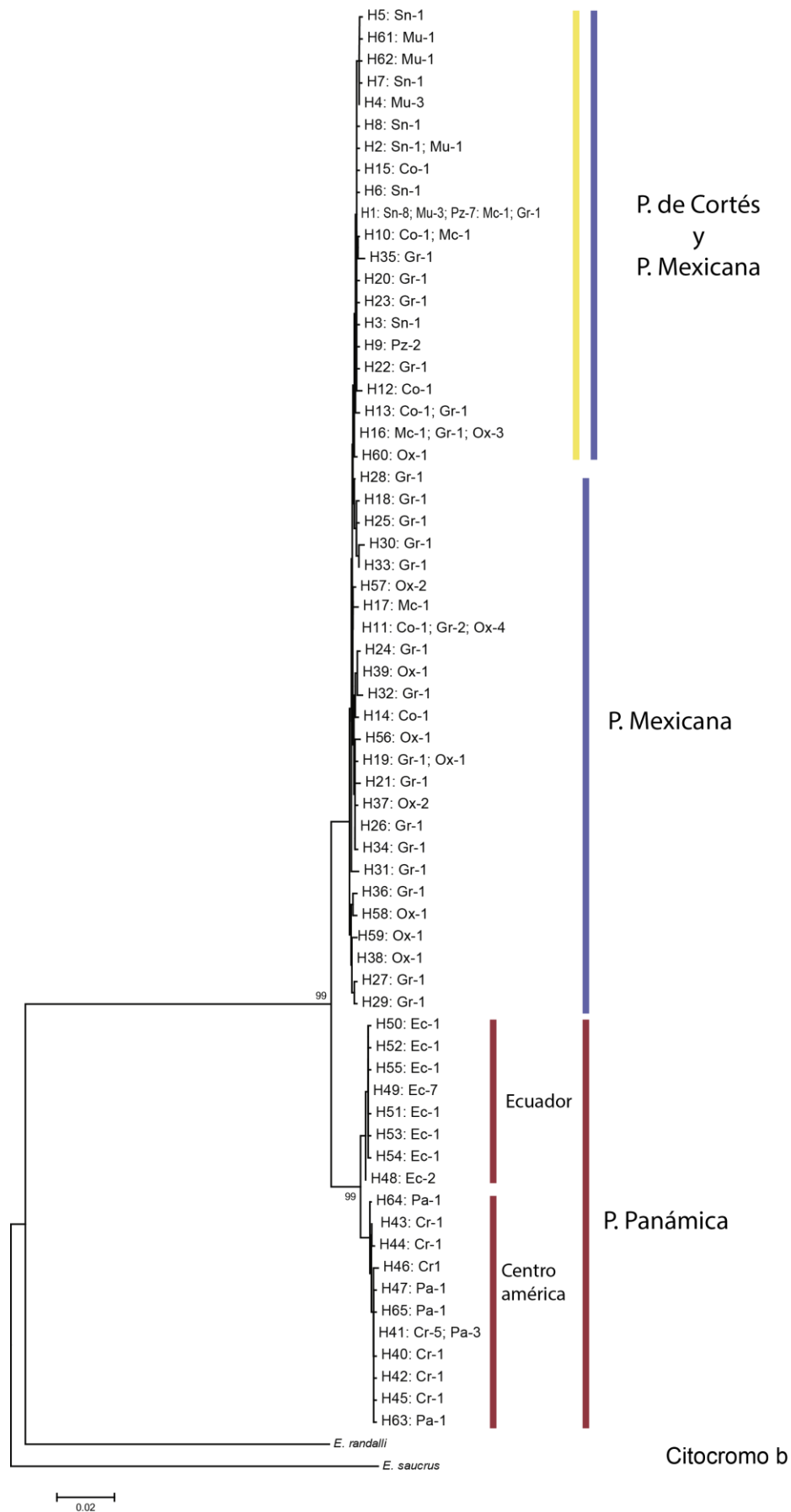


Figura 9. Reconstrucción filogenética de *Elacatinus puncticulatus* con base en 65 haplotipos de Cytb, usando el método de NJ. Se indica el número del haplotipo, el número de individuos que lo comparten y la localidad a la que pertenecen. Sn: Sonora; Mu: Mulegé; Pz: La Paz; Co: Colima; Mc: Michoacán; Gr: Guerrero; Ox: Oaxaca; Cr: Costa Rica; Pa: Panamá; Ec: Ecuador.

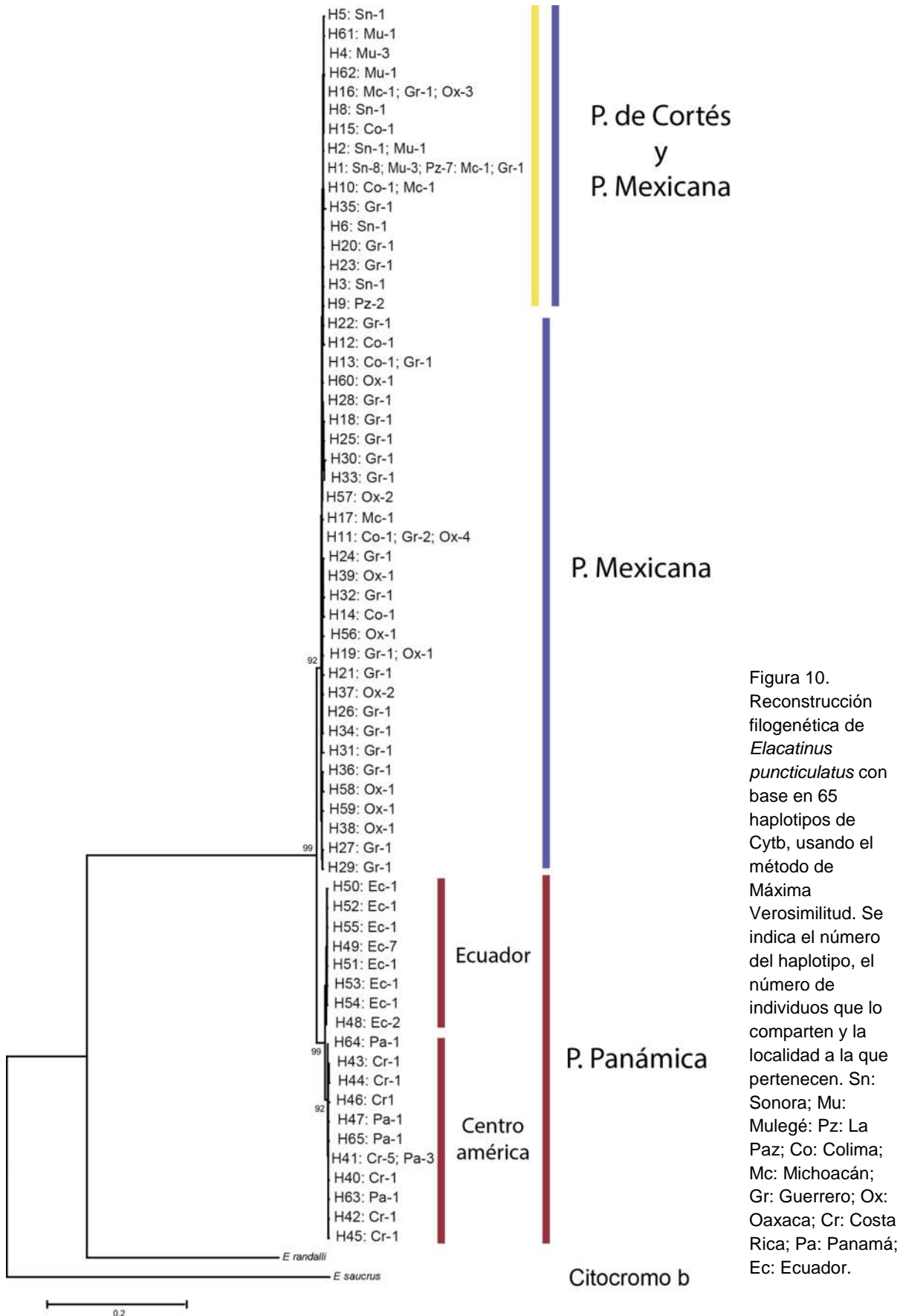


Figura 10. Reconstrucción filogenética de *Elacatinus puncticulatus* con base en 65 haplotipos de Cytb, usando el método de Máxima Verosimilitud. Se indica el número del haplotipo, el número de individuos que lo comparten y la localidad a la que pertenecen. Sn: Sonora; Mu: Mulegé; Pz: La Paz; Co: Colima; Mc: Michoacán; Gr: Guerrero; Ox: Oaxaca; Cr: Costa Rica; Pa: Panamá; Ec: Ecuador.

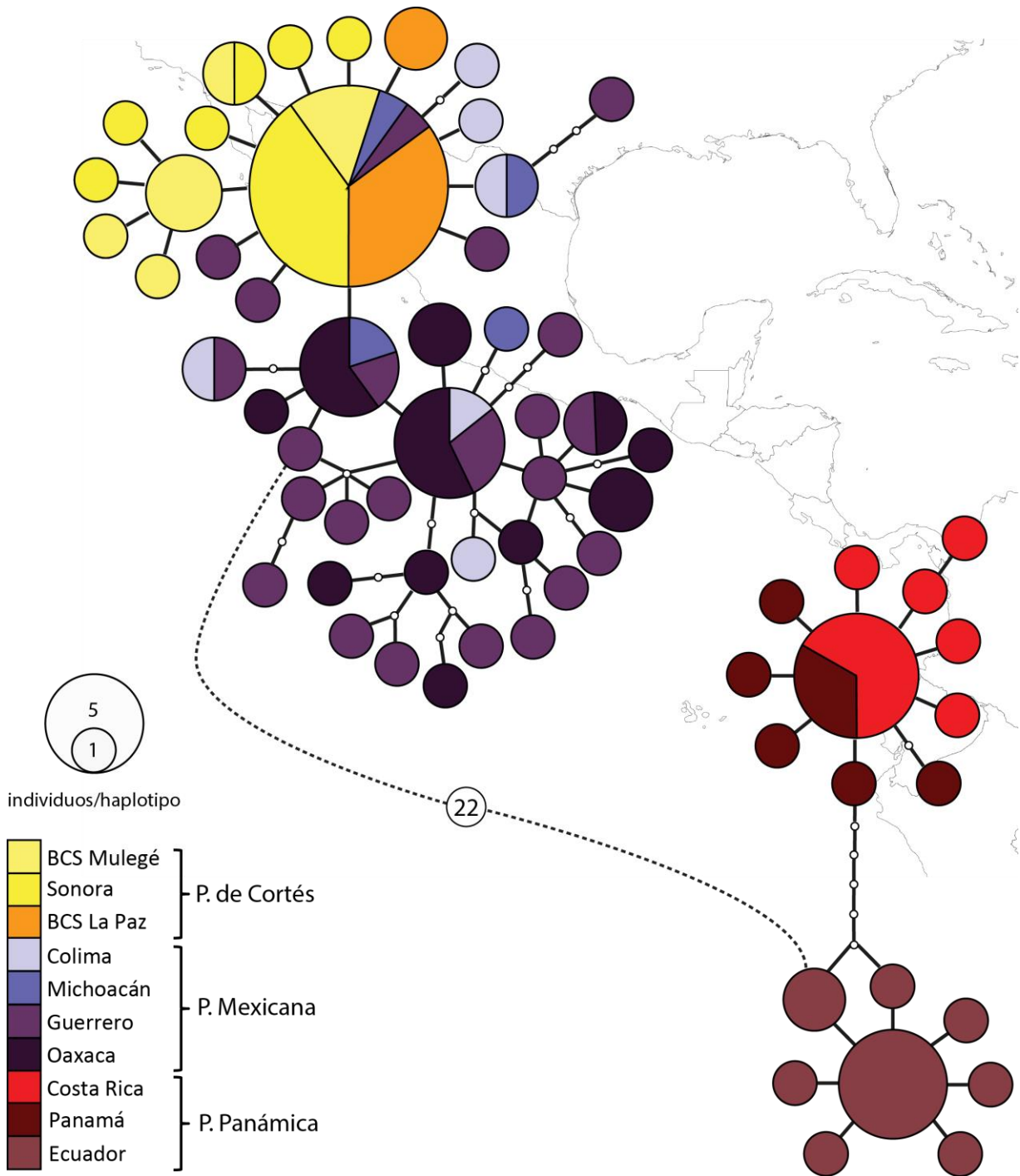


Figura 11. Red de haplotipos obtenida con el gen mitocondrial citocromo b de 117 individuos de *Elacatinus puncticulatus*. Cada círculo representa uno de los 65 haplotipos, el tamaño de los círculos representa el número de individuos que comparten el mismo haplotipo (ver escala en la figura). Los círculos en blanco representan haplotipos hipotéticos. Las líneas de conexión no presentan la misma escala debido a que fueron ajustadas a la red. Máximo número de pasos para conectar redes: 14 (95% Conf.).

*Diferenciación y Distancias Genética.* Los valores del índice de diferenciación  $F_{ST}$  y las distancias genéticas estimadas entre pares de poblaciones, se resumen en la Tabla 6. Los valores negativos de  $F_{ST}$  fueron remplazados por ceros. Se encontraron niveles altos y significativos de diferenciación genética entre las poblaciones de las Provincias de Cortés y Mexicana, con respecto a las de la Provincia Panámica ( $F_{ST}=0.863-0.970$ ). Dentro de la Provincia Panámica, se encontraron valores altos y significativos de diferenciación entre Ecuador con respecto a Costa Rica ( $F_{ST}=0.875$ ) y Panamá ( $F_{ST}=0.858$ ). Entre las poblaciones de la Provincia de Cortés y la Provincia Mexicana se encontró poca diferenciación ( $F_{ST}=0.118-0.666$ ), pero significativa en la mayoría de los casos.

Las distancias genéticas entre las poblaciones de la Provincia de Cortés y la Provincia Mexicana fueron bajas (0.083-0.371%). En cambio, las distancias entre las poblaciones Provincias de Cortés y Mexicana, con respecto a las de la Provincia Panámica fueron de entre 2.17 y 2.43%. Dentro de la Provincia Panámica, las distancias entre Ecuador con respecto a Costa Rica y Panamá, fueron de 0.766% y 0.748% respectivamente

**Tabla 6. Izquierda: Valores del índice de diferenciación  $F_{ST}$ . Los valores con  $p < 0.05$  se muestran en negritas. Derecha: Distancias genéticas  $p$  (%) y Error Estándar de las secuencias de Cytb.**

Población	BCS Mulegé	Sonora	BCS La Paz	Colima	Michoacán	Guerrero	Oaxaca	Costa Rica	Panamá	Ecuador
BCS Mulegé		0.102±0.05	0.083±0.03	0.226±0.07	0.182±0.06	0.353±0.10	0.318±0.11	2.348±0.43	2.375±0.43	2.179±0.42
Sonora	0.0911		0.092±0.11	0.241±0.09	0.197±0.13	0.369±0.12	0.334±0.16	2.364±0.45	2.390±0.44	2.194±0.43
BCS La Paz	0.2750	0.0272		0.211±0.07	0.167±0.06	0.337±0.14	0.301±0.10	2.333±0.11	2.36±0.44	2.164±0.30
Colima	0.2044	0.1565	0.1663		0.249±0.08	0.371±0.09	0.318±0.09	2.401±0.42	2.427±0.43	2.231±0.42
Michoacán	0.2552	0.1869	0.2665	0.00		0.337±0.08	0.280±0.08	2.342±0.42	2.368±0.42	2.173±0.41
Guerrero	0.2593	0.2488	0.2729	0.0128	0.00		0.330±0.07	2.393±0.41	2.419±0.42	2.209±0.41
Oaxaca	0.4433	0.4356	0.4300	0.1282	0.1276	0.0044		2.342±0.42	2.368±0.42	2.173±0.41
Costa Rica	0.9562	0.9576	0.9699	0.9252	0.9420	0.8697	0.9158		0.118±0.04	0.766±0.23
Panamá	0.9506	0.9536	0.9660	0.9138	0.9311	0.8625	0.9097	0.0201		0.748±0.23
Ecuador	0.9558	0.9564	0.9671	0.9311	0.9454	0.8724	0.9179	0.8751	0.8584	

Para el AMOVA, las poblaciones fueron agrupadas en diferentes arreglos de acuerdo a la región biogeográfica a la que pertenecen (Tabla 7). Los agrupamientos se realizaron tomando en cuenta las provincias en primer lugar, comparándolas por pares y después se compararon las tres provincias. Posteriormente, la de Cortés y la Mexicana se conjuntaron formando el grupo de México, las poblaciones de Panamá y Costa Rica forman el grupo de Centroamérica. El arreglo con mayor variación entre grupos fue el que comparó a los grupos de México, Centroamérica y Ecuador (88.23%).

Tabla 7. AMOVA entre poblaciones de *Elacatinus puncticulatus* con base en las secuencias del gen Cytb.

Grupos	FST	FCT	FSC	% de variación			p
				Entre Grupos	Entre Poblaciones dentro de los Grupos	Entre Poblaciones	
P. Cortés/ P. Mexicana	0.3037	0.2776	0.0363	27.75	2.62	69.63	<0.0313
P. Cortés/ P. Panámica	0.9589	0.8444	0.7358	84.44	11.45	4.11	<0.0890
P. Mexicana/ P. Panámica	0.8937	0.8061	0.4517	80.61	8.76	10.63	<0.0244
P. Cortés/ P. Mexicana/ P. Panámica	0.8714	0.7760	0.4258	77.60	9.54	12.86	<0.0000
México/ P. Panámica	0.9015	0.8217	0.4479	83.64	7.49	8.87	<0.0078
P. Cortés/ P. Mexicana/ Centroamérica/ Ecuador	0.8687	0.8624	0.04584	86.24	0.63	13.13	<0.0235
México/ Centroamérica/ Ecuador	0.9089	0.8823	0.2262	<b>88.23</b>	2.66	9.11	<0.0020

En el SAMOVA se evaluó la variación entre dos, tres y cuatro grupos (Tabla 8). El arreglo de dos grupos, dividió las poblaciones de México y las de la Provincia Panámica (Centro-Sudamérica) con un porcentaje de variación de 83.64%. El máximo porcentaje de variación se obtuvo en el arreglo de tres grupos (88.23%). Este arreglo separó a las poblaciones de México, Centroamérica y Ecuador. El arreglo de cuatro grupos dividió a las



poblaciones de México, Costa Rica, Panamá y Ecuador (Fig. 12) con un porcentaje de variación entre grupos del 87.51%.

Tabla 8. SAMOVA entre poblaciones de *Elacatinus puncticulatus* con base en secuencias del gen Cytb.

Grupos	FST	FCT	FSC	% de variación			p
				Entre Grupos	Entre Poblaciones dentro de los Grupos	Entre Poblaciones	
2) México/ P. Panámica	0.9113	0.8346	0.4579	83.64	7.49	8.87	< 0.0078
3) México/ Centroamérica/ Ecuador	0.9089	0.8823	0.2262	<b>88.23</b>	2.66	9.11	< 0.0029
4) México/ Costa Rica/ Panamá/ Ecuador	0.9064	0.8751	0.2510	87.51	3.13	9.36	< 0.0108

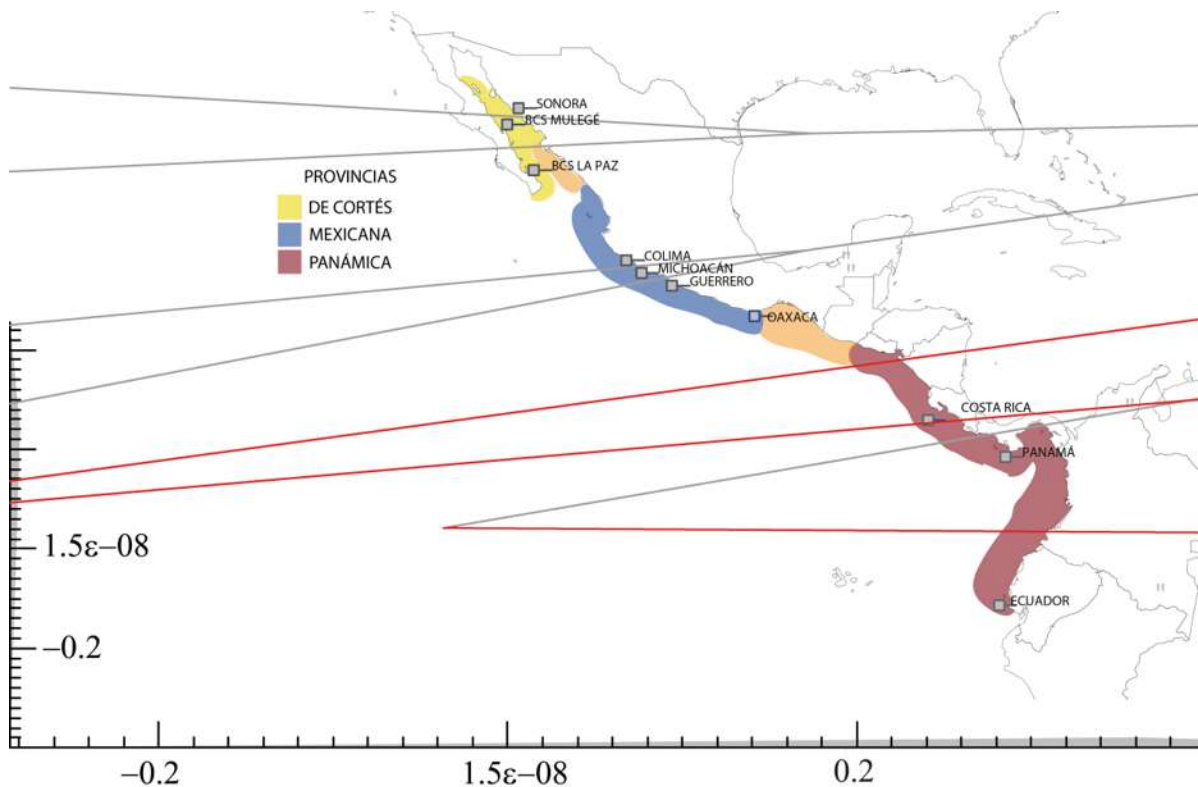


Figura 12. Descripción gráfica del SAMOVA. El mapa de distribución de *Elacatinus puncticulatus* fue empalmado con la ubicación de las poblaciones utilizadas para el análisis. Las líneas en rojo indican el intervalo de confianza de la ubicación de las barreras entre los grupos de poblaciones definidos.

*Distribución Mismatch*: Las distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias no se ajustaron al modelo esperado para una población de tamaño constante. Las poblaciones de los agrupamientos de México (Provincias de Cortés y Mexicana), Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y Ecuador presentan una distribución que indica que han experimentado una expansión demográfica (Tabla 9 y Fig. 13) con valores bajos de  $r$  y  $R^2$ .

Tabla 9. Distribución Mismatch de grupos de poblaciones y valores de los estadísticos  $r$  de Raggedness y  $R^2$  de Ramos-Onsins y Rozas (2002).

Grupos	Numero de Secuencias	Estadísticos	
		$r$	$R^2$
México	84	0.0162	0.0266
Centroamérica	18	0.1217	0.0552
Ecuador	15	0.2473	0.0722

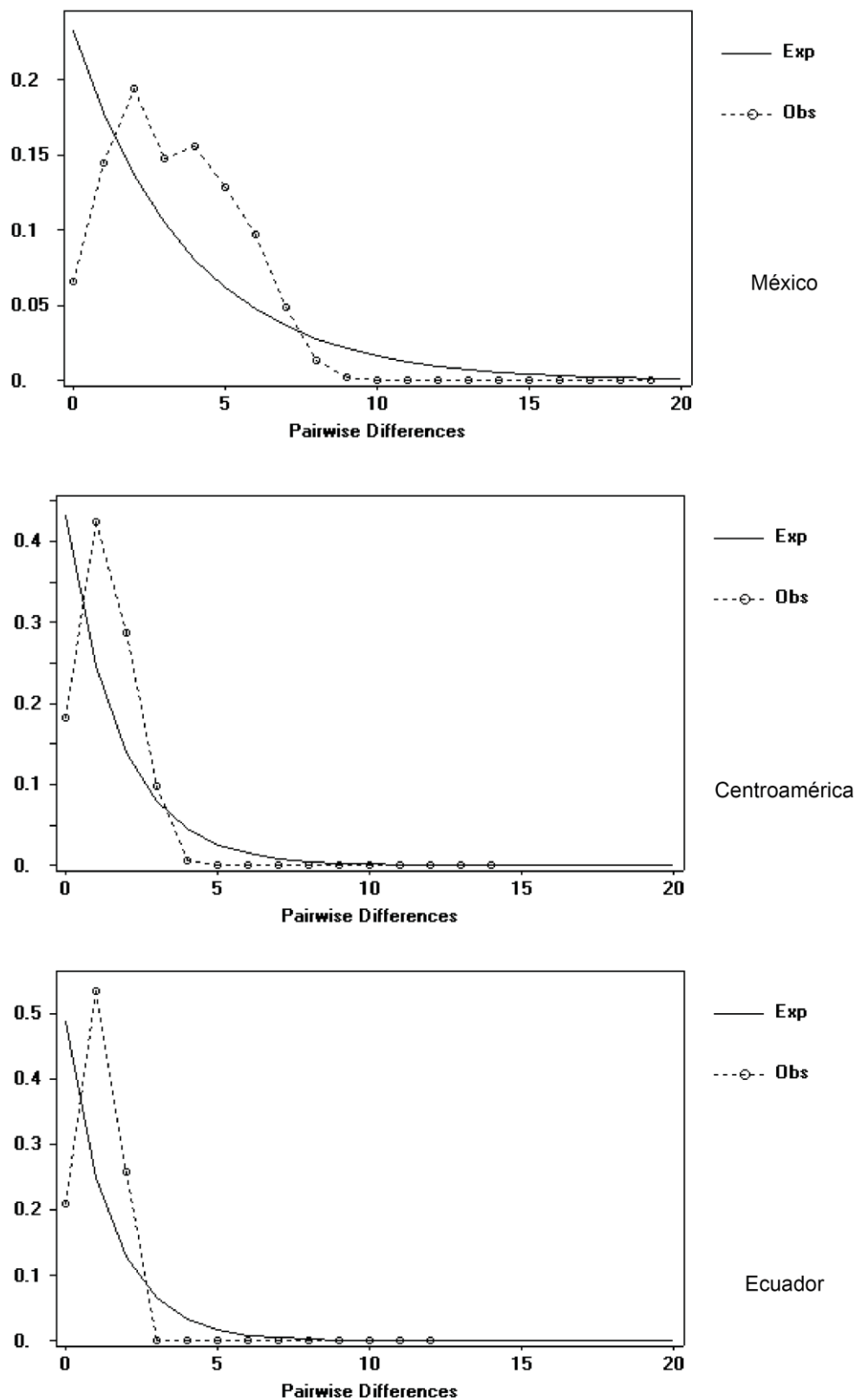


Figura 13. Gráficos de la Distribución Mismatch (Distribución de Diferencias por Pares).

*Tiempos de divergencia.* La filogenia obtenida mediante el análisis bayesiano de coalescencia, identificó las relaciones ya establecidas con el análisis del NJ (Fig. 14).

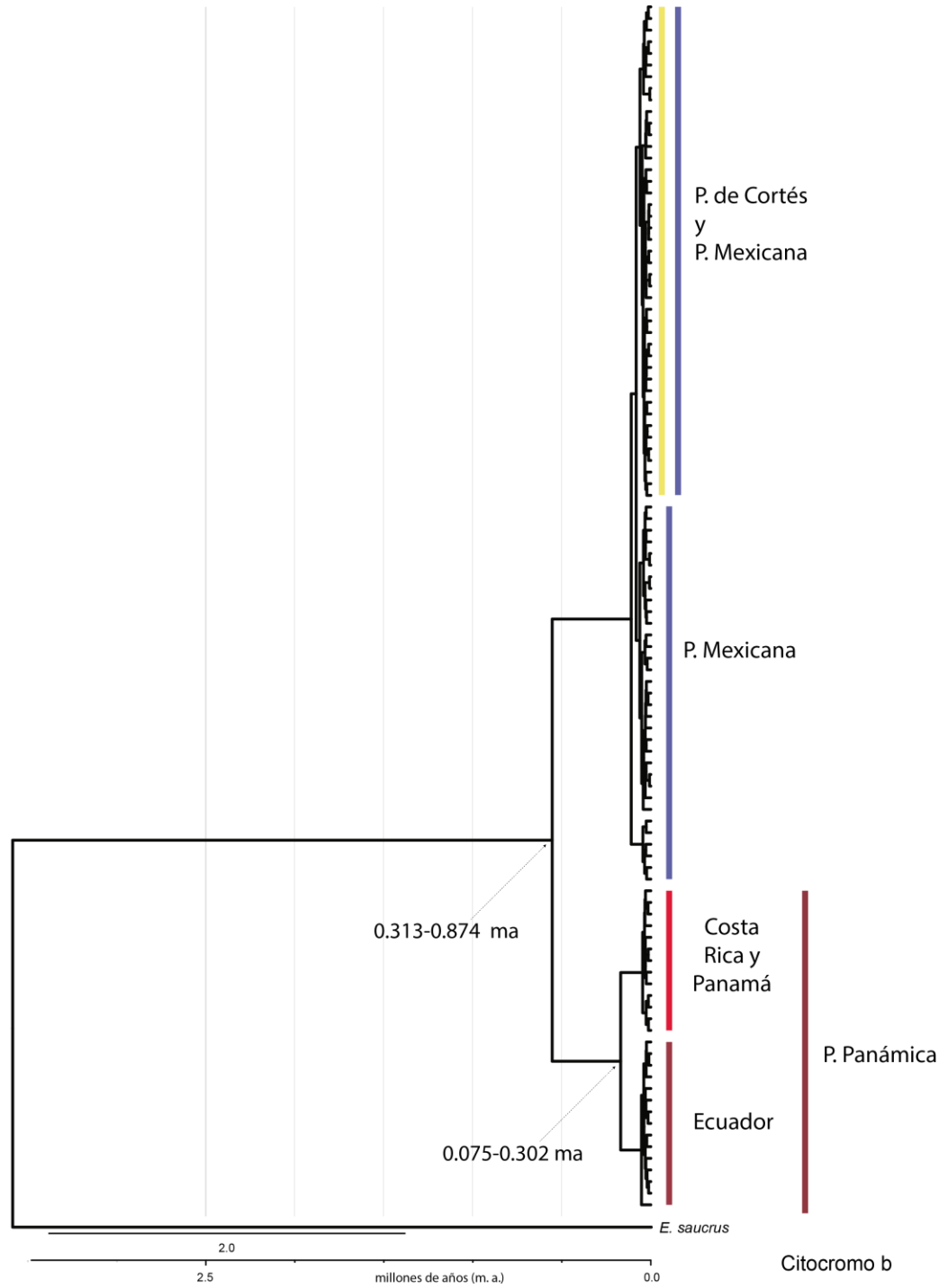


Figura 14. Reconstrucción filogenética por inferencia bayesiana de coalescencia y estimación de tiempos de divergencia de los clados de *Elacatinus puncticulatus*, con secuencias de Cytb

Entre el clado de las Provincias de Cortés y Mexicana y el clado de la Provincia Panámica, se estimó un tiempo de divergencia (con un intervalo de confianza del 95%) de 0.313 a 0.8736 m. a. La subdivisión de la Provincia Panámica, que separa a Centroamérica de Ecuador se estimó entre 0.075 a 0.3017 m. a.

**RC**

*Estadísticos descriptivos.* Se secuenciaron 407 pb de la RC de 37 individuos de *Elacatinus puncticulatus*. Se obtuvieron siete haplotipos únicos, los cuales no se compartieron entre las poblaciones de México con las de Centroamérica y Ecuador. Los índices de diversidad genética se describen en la Tabla 10. Los valores de diversidad haplotípica entre poblaciones fueron bajos ( $H_d=0.0-0.50$ ) así como el de diversidad nucleotídica ( $\pi=0.0-0.0012$ ). Entre provincias los valores de  $H_d$  fueron de 0.0- 0.717 y los de  $\pi$  fueron de 0.0-0.0032.

Tabla 10. Índices de diversidad genética de la RC para *Elacatinus puncticulatus*

Provincia	Población	N	Hn	$H_d \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$	k	S
De Cortés	Sonora	4	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	B. C. S. (Mulegé)	6	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	B. C. S. (La Paz)	1	1	-	-	-	-
	<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>	<b>0.000 ± 0.000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Mexicana	Colima	5	2	0.40 ± 0.237	0.0012 ± 0.0006	0.4	1
	Guerrero	2	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	Michoacán	2	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	Oaxaca	1	1	-	-	-	-
	<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>0.20 ± 0.0238</b>	<b>0.0005 ± 0.0004</b>	<b>0.2</b>	<b>1</b>
Panámica	Costa Rica	8	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	Panamá	4	2	0.50 ± 0.265	0.0012 ± 0.0007	0.5	1
	Ecuador	4	2	0.50 ± 0.265	0.0012 ± 0.0007	0.5	1
	<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>0.717 ± 0.095</b>	<b>0.00324 ± 0.0006</b>	<b>1.327</b>	<b>4</b>
<b>Total</b>		<b>37</b>	<b>7</b>	<b>0.664 ± 0.070</b>	<b>0.00645 ± 0.0006</b>	<b>2.623</b>	<b>7</b>

N=número de individuos, Hn=número de haplotipos,  $H_d$ =diversidad haplotípica,  $\pi$ =diversidad nucleotídica, k=promedio de diferencias nucleótidas por pares, S=número de sitios polimórficos.

*Métodos Filogenéticos y Redes de Haplotipos.* El análisis filogenético realizado con 37 secuencias de RC (Fig. 15), identificó dos clados principales consistentes con respecto a la filogenia obtenida con Cytb. Uno de los clados corresponde a los individuos de las Provincias de Cortés y Mexicana y el otro a los de la Provincia Panámica. La filogenia de RC fue consistente en identificar la subdivisión entre Centroamérica y Ecuador.

La red de haplotipos de la RC (Fig. 16) identificó dos haplogrupos principales separados por tres diferencias nucleotídicas, uno conformado por dos haplotipos de las Provincias de Cortés y Mexicana y el otro de cinco haplotipos que corresponden a la

Provincia Panámica. Además, a diferencia de lo mostrado con Cytb, existe una subdivisión entre Costa Rica, Panamá y Ecuador que se separan por una diferencia nucleotídica.

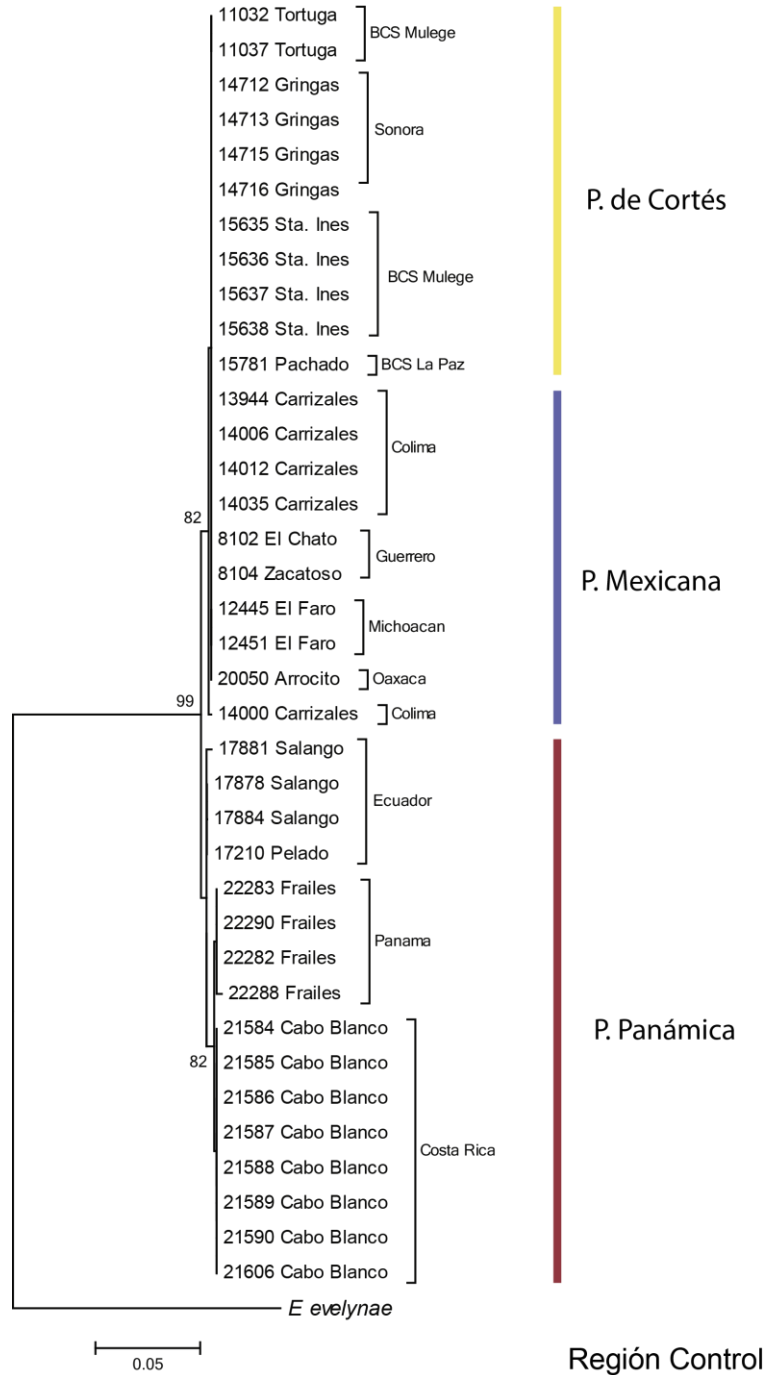


Figura 15. Reconstrucción filogenética de *Elacatinus puncticulatus* con base en secuencias de la RC usando el método de NJ.

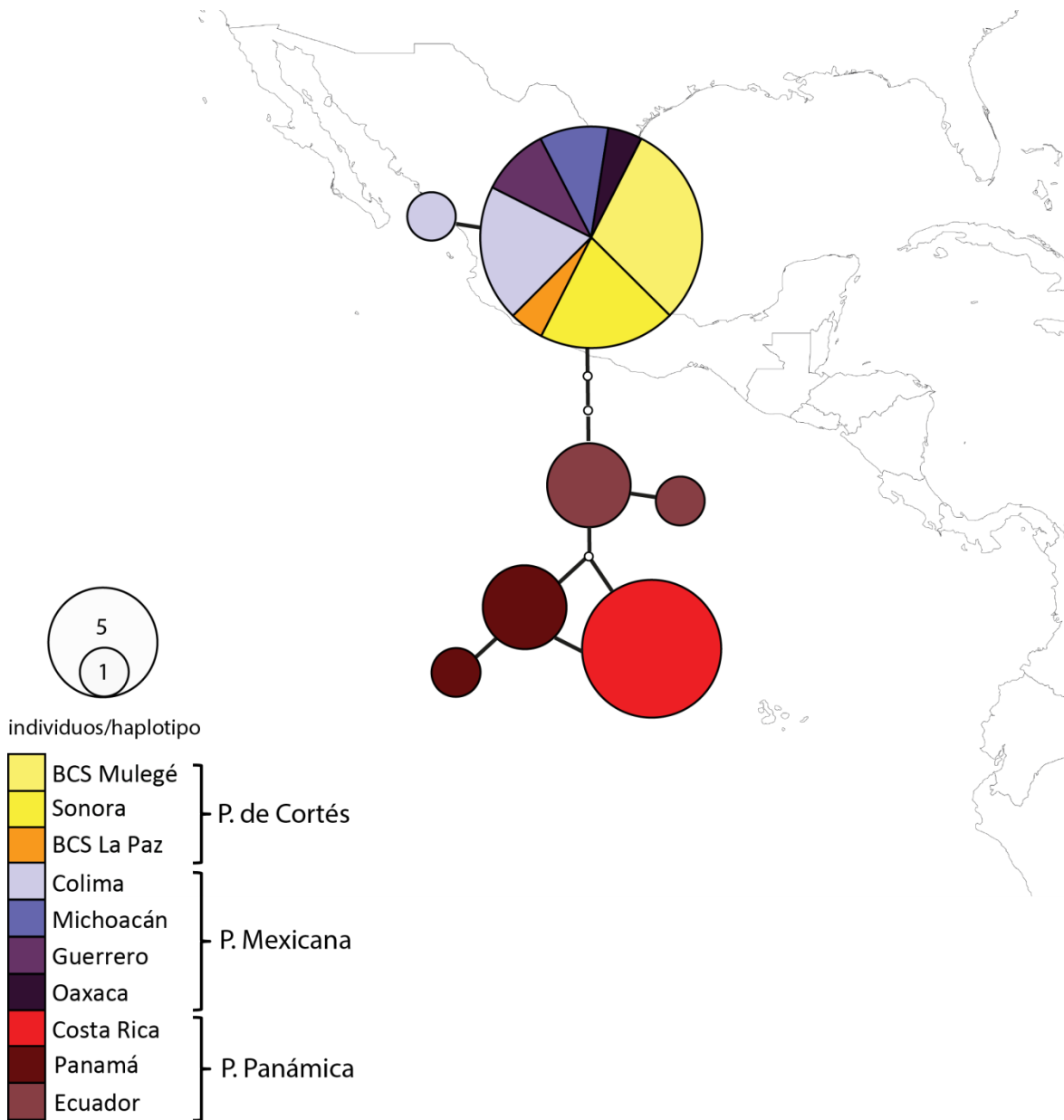


Figura 16. Red de haplotipos obtenida con la Región Control mitocondrial de 37 individuos de *Elacatinus puncticulatus*. Cada círculo representa uno de los siete haplotipos, el tamaño de los círculos representa el número de individuos que comparten el mismo haplotipo (ver escala en la figura). Máximo número de pasos para conectar redes: 8 (95% Conf.)



A pesar de que existe una menor distancia entre los clados y un menor número de diferencias entre los haplogrupos, los resultados obtenidos de la RC son consistentes en relación a los análisis de las secuencias de Cytb.

*Distancias Genéticas.* Las distancias genéticas obtenidas y su error estándar se resumen en la Tabla 11. Las distancias entre las poblaciones de México fueron de 0.0 a 0.49%. Entre las poblaciones de México con respecto a las de Centroamérica y Ecuador, las distancias fueron de 0.799 a 1.29%.

Tabla 11. Izquierda: Distancias genéticas p (%) de las secuencias de RC y Derecha: Error Estándar.

Población	Son	BCS (Mul)	BCS (Paz)	Col	Mich	Gue	Oax	C. Rica	Pan	Ecu
Sonora		0.000	0.000	0.047	0.000	0.000	0.000	0.536	0.536	0.405
BCS (Mulegé)	0.000		0.000	0.047	0.000	0.000	0.000	0.536	0.536	0.405
BCS (La Paz)	0.000	0.000		0.047	0.000	0.000	0.000	0.536	0.536	0.405
Colima	0.049	0.049	0.049		0.047	0.047	0.047	0.536	0.536	0.410
Michoacán	0.000	0.000	0.000	0.049		0.000	0.000	0.536	0.536	0.405
Guerrero	0.000	0.000	0.000	0.049	0.000		0.000	0.536	0.536	0.405
Oaxaca	0.000	0.000	0.000	0.049	0.000	0.000		0.536	0.536	0.405
Costa Rica	1.229	1.229	1.229	1.278	1.229	1.229	1.229		0.246	0.354
Panamá	1.290	1.290	1.290	1.339	1.290	1.290	1.290	0.307		0.357
Ecuador	0.799	0.799	0.799	0.835	0.799	0.799	0.799	0.553	0.614	

## V.III. ADN Nuclear

**Rho**

*Estadísticos descriptivos.* Se obtuvieron 13 secuencias del gen Rho de 816 pb de ocho poblaciones. Los índices de diversidad ( $H_n$ ,  $H_d$ ,  $\pi$ ,  $k$  y  $S$ ) se encuentran resumidos en la Tabla 12. Entre Provincias los valores de  $H_d$  fueron de 0.0 a 0.80 y los de  $\pi$  fueron de 0.0 a 0.0012.

Tabla 12. Índices de diversidad genética de la Rho para *E. puncticulatus*.

Provincia	Población	N	H <sub>n</sub>	H <sub>d</sub> ± $\sigma$	$\pi$ ± $\sigma$	k	S
De Cortés	Sonora	1	1	-	-	-	-
	B. C. S. (La Paz)	1	1	-	-	-	-
	<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Mexicana	Colima	1	1	-	-	-	-
	Guerrero	2	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0	0
	Michoacán	2	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Panámica	Costa Rica	2	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0	0
	Ecuador	3	2	0.667 ± 0.314	0.0008 ± 0.0004	0.667	1
	<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>0.80 ± 0.164</b>	<b>0.00123 ± 0.0003</b>	<b>1.0</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>		<b>13</b>	<b>4</b>	<b>0.615 ± 0.0018</b>	<b>0.00104 ± 0.0003</b>	<b>0.846</b>	<b>2</b>

N=número de individuos, H<sub>n</sub>=número de haplotipos, H<sub>d</sub>=diversidad haplotípica,  $\pi$ =diversidad nucleotídica, k=promedio de diferencias nucleótidas por pares, S=número de sitios polimórficos.

*Métodos Filogenéticos y Redes de Haplotipos.* El análisis filogenético realizado con las secuencias de Rho (Fig. 17), fue congruente en la identificación de los dos clados observados anteriormente mediante el análisis de las secuencias de ADNmt. Además, es consistente en identificar la subdivisión entre Centroamérica (Costa Rica) con respecto a Ecuador.

La red de haplotipos de Rho (Fig. 18), soportó los resultados de las redes de ADNmt, el haplogrupo de las Provincias De Cortés y Mexicana no muestra haplotipos compartidos con el de la Provincia Panámica. La red de haplotipos soportó la existencia de una subdivisión de la Provincia Panámica mostrada por el ADNmt.

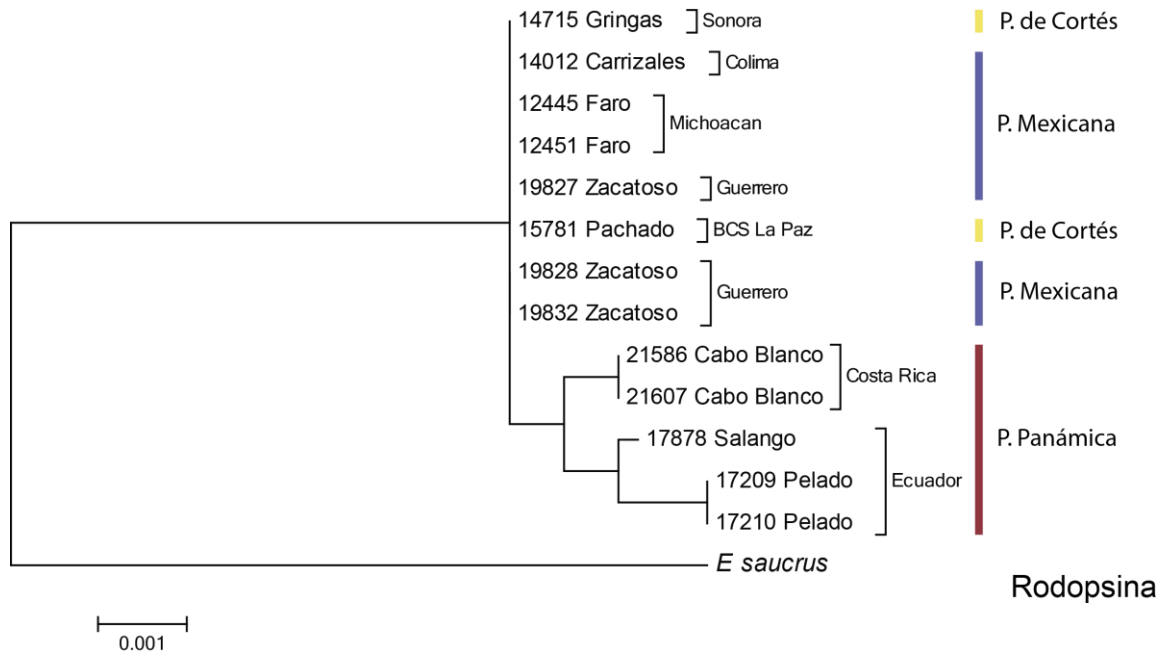


Figura 17. Reconstrucción filogenética de *Elacatinus puncticulatus* con base en secuencias de la Rho usando el método del NJ.

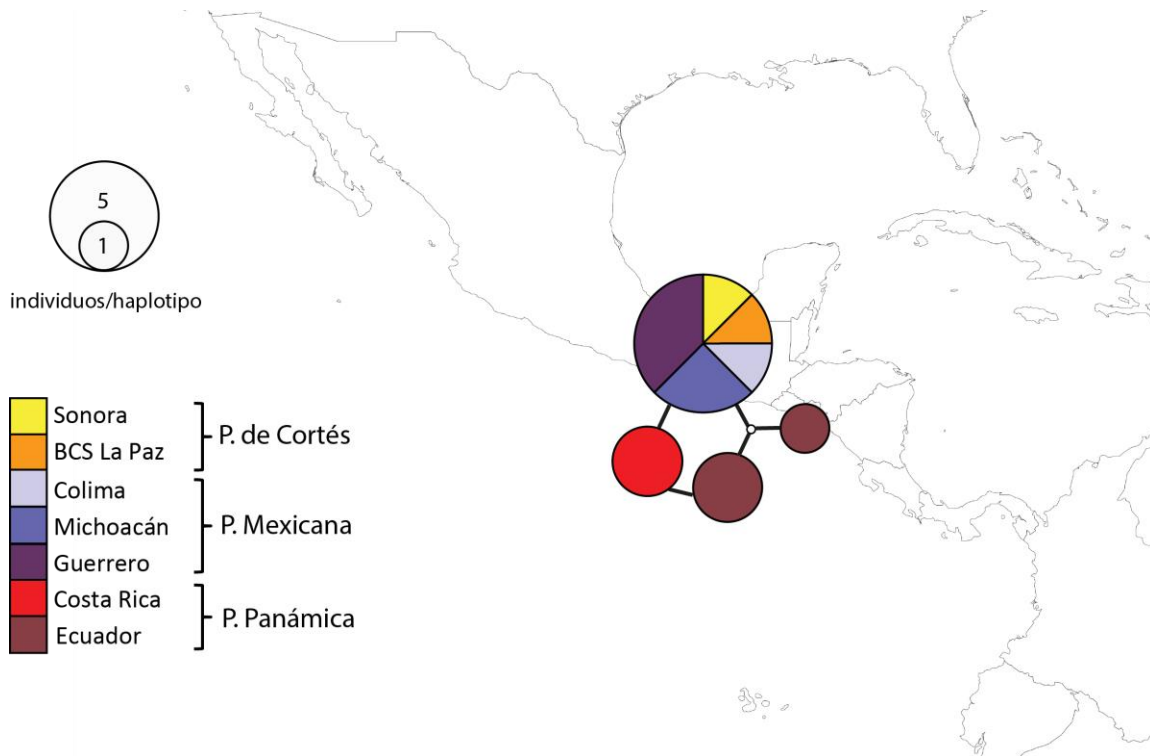


Figura 18. Red de haplotipos de secuencias de la Rodopsina de 13 individuos de *Elacatinus puncticulatus*. Cada círculo representa uno de los cuatro haplotipos diferentes, el tamaño de los círculos representa el número de individuos que comparten el mismo haplotipo (ver escala en la figura). Máximo número de pasos para conectar redes: 11 (95% Conf.)

*Distancias Genéticas.* Las distancias genéticas obtenidas y su error estándar se resumen en la Tabla 13. Las distancias entre las poblaciones de la Provincia De Cortés y la Provincia Mexicana fueron del 0.0%. Entre estas poblaciones con respecto a las de la Provincia Panámica, las distancias fueron de 0.123% para Costa Rica y 0.204% para Ecuador.

Tabla 13. Izquierda: Distancias genéticas p (%) de las secuencias de Rho y Derecha: Error Estándar.

Población	Sonora	BCS (La Paz)	Colima	Michoacán	Guerrero	Costa Rica	Ecuador
Sonora		0.000	0.000	0.000	0.000	0.122	0.145
BCS (La Paz)	0.000		0.000	0.000	0.000	0.122	0.145
Colima	0.000	0.000		0.000	0.000	0.122	0.145
Michoacán	0.000	0.000	0.000		0.000	0.122	0.145
Guerrero	0.000	0.000	0.000	0.000		0.122	0.145
Costa Rica	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123		0.127
Ecuador	0.204	0.204	0.204	0.204	0.204	0.163	

**S7**

*Estadísticos descriptivos.* Se obtuvieron 29 secuencias de S7 de 735 pb de 10 poblaciones. Los índices de diversidad ( $H_n$ ,  $H_d$ ,  $\pi$ ,  $k$  y  $S$ ) se encuentran resumidos en la Tabla 14. Entre provincias los valores de  $H_d$  fueron de 0.0 a 0.409 y los de  $\pi$  fueron de 0.0 a 0.0054.

Tabla 14. Índices de diversidad genética de S7 para *E. puncticulatus*

Provincia	Población	N	$H_n$	$H_d \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$	$k$	$S$
De Cortés	Sonora	2	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	B. C. S. (Mulegé)	2	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	B. C. S. (La Paz)	3	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>0.00 ± 0.00</b>	<b>0.000 ± 0.000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Mexicana	Colima	2	1	0.50 ± 0.265	0.0007 ± 0.0004	0.5	1
	Guerrero	3	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	Michoacán	3	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	Oaxaca	2	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>0.409 ± 0.133</b>	<b>0.0006 ± 0.0002</b>	<b>0.409</b>	<b>1</b>
Panámica	Costa Rica	4	2	0.50 ± 0.265	0.0007 ± 0.0004	0.5	1
	Panamá	3	2	0.667 ± 0.314	0.0009 ± 0.0004	0.667	1
	Ecuador	3	1	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0	0
	<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>0.378 ± 0.181</b>	<b>0.0054 ± 0.0003</b>	<b>0.4</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>5</b>	<b>0.628 ± 0.073</b>	<b>0.0011 ± 0.0002</b>	<b>0.798</b>	<b>4</b>	

N=número de individuos,  $H_n$ =número de haplotipos,  $H_d$ =diversidad haplotípica,  $\pi$ =diversidad nucleotídica,  $k$ =promedio de diferencias nucleótidas por pares,  $S$ =número de sitios polimórficos.

*Métodos Filogenéticos y Redes de Haplotipos.* El análisis filogenético realizado con las secuencias de S7 (Fig. 19), fue congruente en la identificación de los dos clados observados anteriormente mediante el análisis de las secuencias de ADNmt y Rho. En esta inferencia, no se aprecia la subdivisión entre Centroamérica (Costa Rica) con respecto a Ecuador.

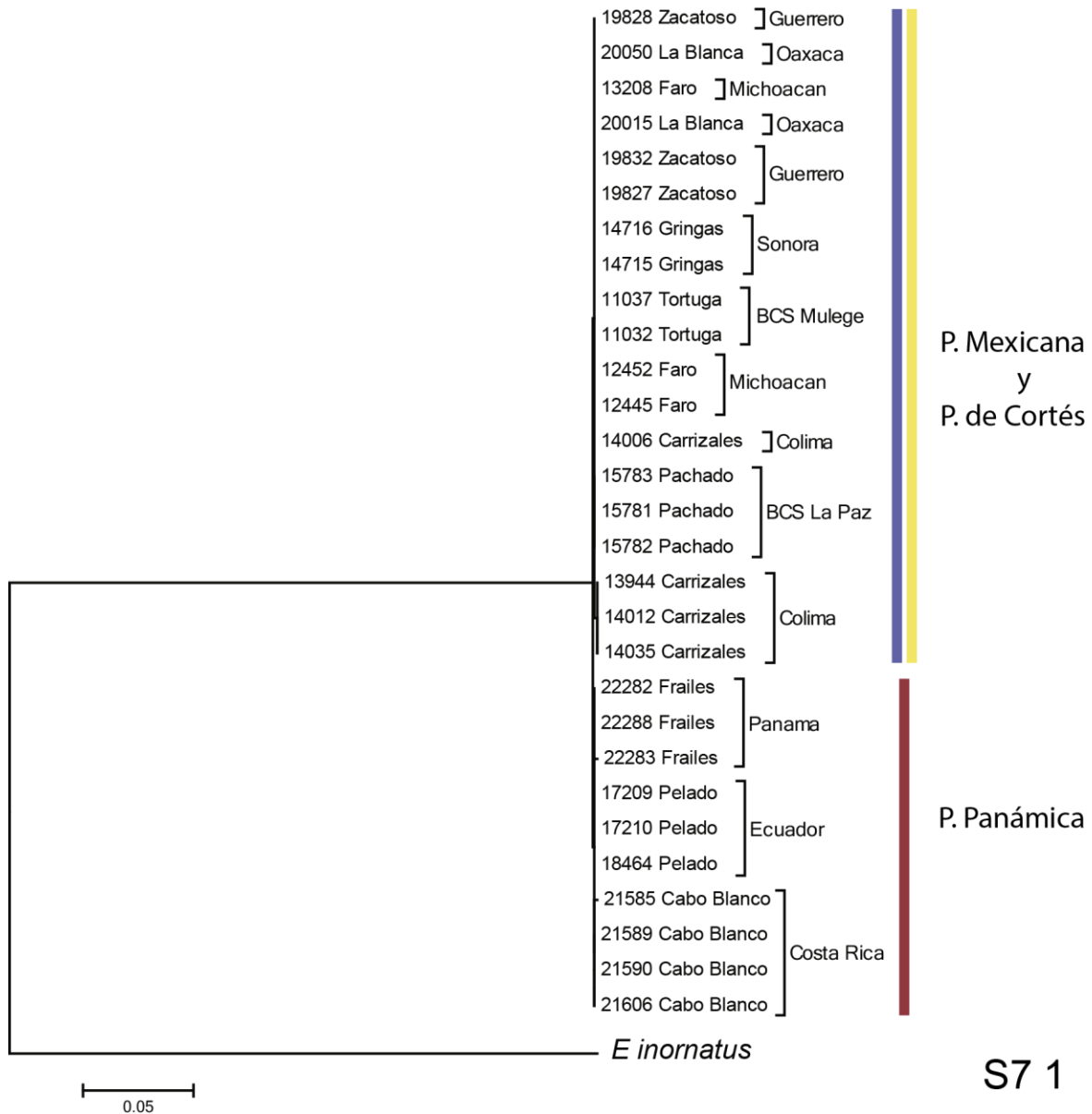


Figura 19. Reconstrucción filogenética de *Elacatinus puncticulatus* con base en secuencias del intrón S7 1 usando el método del NJ.

La red de haplotipos de S7 (Fig. 20) soportó los resultados de las redes de ADNmt y Rho. Los haplogrupos de las Provincias de Cortés y Mexicana no muestran haplotipos compartidos con la Provincia Panámica. En esta red, no se aprecia la subdivisión entre las poblaciones de Centroamérica y Ecuador.

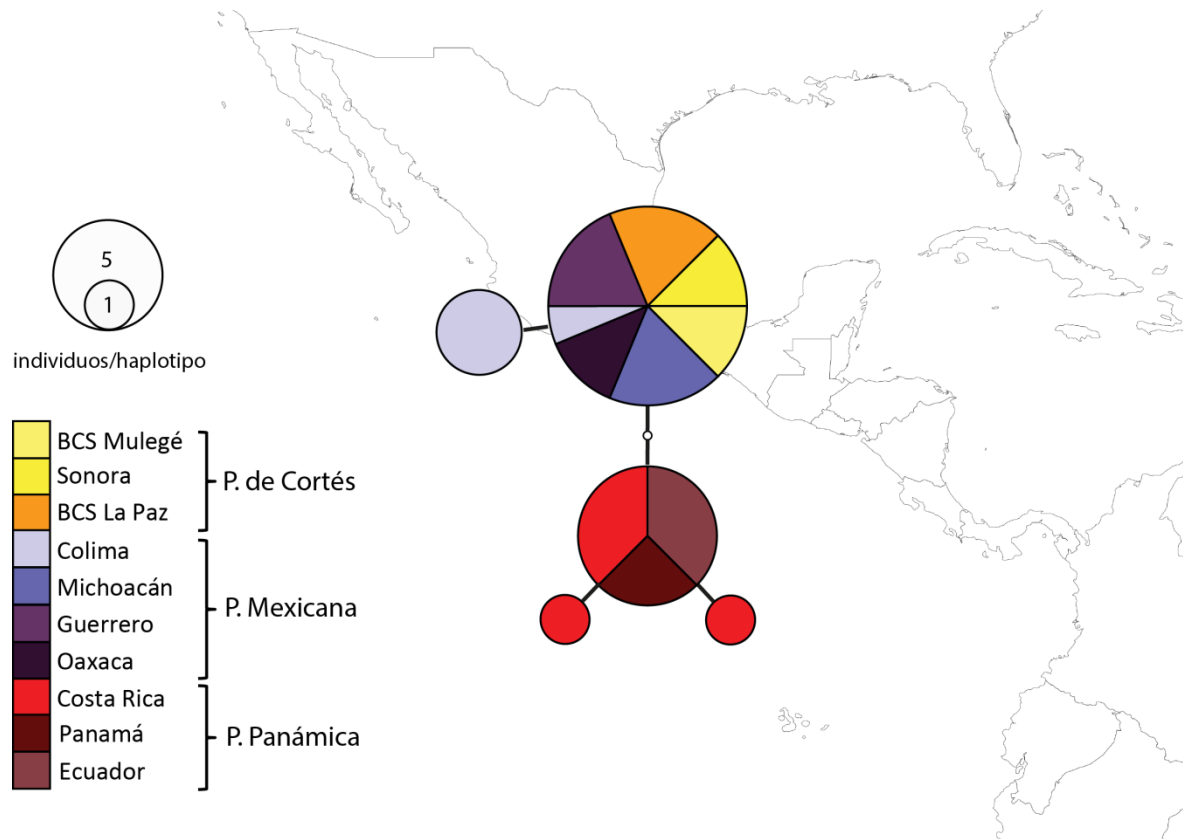


Figura 20. Red de haplotipos de secuencias de S7 de 29 individuos de *Elacatinus puncticulatus*. Cada círculo representa uno de los cinco haplotipos diferentes, el tamaño de los círculos representa el número de individuos que comparten el mismo haplotipo (ver escala en la figura). Máximo número de pasos para conectar redes: 11 (95% Conf.)

*Distancias Genéticas.* Las distancias genéticas obtenidas y su error estándar se resumen en la Tabla 15. Las distancias entre las poblaciones de las Provincias de Cortés y Mexicana fueron en su mayoría de 0.0%, excepto por Colima que mostró una distancia de 0.1% con el resto de las poblaciones. Entre las poblaciones de las Provincias de Cortés y Mexicana con respecto a las de la Provincia Panámica, las distancias fueron de entre 0.136 y 0.182%. Dentro de la Provincia Panámica, las distancias entre las poblaciones de Centroamérica y Ecuador fueron de 0.034% a 0.045%. Entre Costa Rica y Panamá se estimó una distancia de 0.079%.

Tabla 15. Izquierda: Distancias genéticas p (%) de las secuencias de S7 y Derecha: Error Estándar.

Población	Son	BCS (Mul)	BCS (Paz)	Col	Mich	Gue	Oax	C. Rica	Pan	Ecu
Sonora		0.000	0.000	0.095	0.000	0.000	0.000	0.131	0.131	0.126
BCS (Mulegé)	0.000		0.000	0.095	0.000	0.000	0.000	0.131	0.131	0.126
BCS (La Paz)	0.000	0.000		0.095	0.000	0.000	0.000	0.131	0.131	0.126
Colima	0.102	0.102	0.102		0.095	0.095	0.095	0.171	0.169	0.166
Michoacán	0.000	0.000	0.000	0.102		0.000	0.000	0.131	0.131	0.126
Guerrero	0.000	0.000	0.000	0.102	0.000		0.000	0.131	0.131	0.126
Oaxaca	0.000	0.000	0.000	0.102	0.000	0.000		0.131	0.131	0.126
Costa Rica	0.170	0.170	0.170	0.272	0.170	0.170	0.170		0.055	0.034
Panamá	0.182	0.182	0.182	0.284	0.182	0.182	0.182	0.079		0.043
Ecuador	0.136	0.136	0.136	0.238	0.136	0.136	0.136	0.034	0.045	



## VI. DISCUSIÓN

### Diversidad genética

La comparación de los índices de diversidad genética ( $H_d$ ,  $\pi$  y  $k$ ) entre marcadores moleculares, indicaron que los valores obtenidos para Cytb del total de individuos de *Elacatinus puncticulatus*, fueron notablemente mayores ( $H_d=0.959$ ;  $\pi=0.0112$ ;  $k=12.751$ ) a lo mostrado por las secuencias de Rho ( $H_d=0.615$ ;  $\pi=0.0010$ ;  $k=0.846$ ) y S7 ( $H_d=0.628$ ;  $\pi=0.0011$ ;  $k=0.798$ ), siendo incluso mayores a los de la RC ( $H_d=0.664$ ;  $\pi=0.0065$ ;  $k=2.623$ ). Estudios previos han revelado un intervalo variado en los valores de diversidad genética en poblaciones de peces marinos, incluyendo peces arrecifales. La  $H_d$  se ha estimado en valores que se extienden desde 0 a 1, mientras que la  $\pi$  tiene un intervalo de 0.0007 a 0.318 (Craig *et al.*, 2006; Fauvelot *et al.*, 2003; Haney *et al.*, 2007; Gaither *et al.*, 2011). Para peces marinos, los valores de  $H_d < 0.5$  y  $\pi < 0.005$  son considerados como niveles bajos de diversidad genética (Hobbs *et al.*, 2013). En los cuatro marcadores moleculares, la  $H_d$  mostró valores mayores a 0.5 para el total de los individuos (Tablas 4, 10, 12 y 14), Cytb fue el único con valores de  $H_d$  mayores a 0.5 para las tres provincias y para la mayoría de las poblaciones. La mayor variabilidad genética de las secuencias de Cytb en comparación con las de ADN nuclear, se relaciona con las características particulares de cada marcador. El ADNmt tiene una alta tasa mutacional, considerada al menos diez veces superior al ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979). Esto se debe en gran medida a que el ADNmt no posee secuencias de ADN regulador, donde las enzimas polimerasas corrigen “errores” durante el proceso de replicación o de transcripción. Siendo la RC un segmento no codificante del ADNmt, se esperaba una alta variabilidad, sin embargo los resultados obtenidos no mostraron este patrón. Aunque muchos estudios en peces han usado la RC encontrando una gran variación (Riginos y Nachman, 2001; Fauvelot *et al.*, 2003; Schönhuth *et al.*, 2012), en *E. puncticulatus* esta región fue menos variable que Cytb. Resultados similares han sido publicados, Johnstone *et al.* (2007) por ejemplo, encontraron en peces marinos del género *Anarhichas* (peces lobo) una menor variación de la RC con respecto a otros loci de ADNmt. En el caso de los meros *Epinephelus labriformis* y *E. clippertonensis*, se encontraron niveles similares de variación entre Cytb y la RC (Craig *et al.*, 2006). Esto indica que la “hipervariabilidad” de la RC no es consistente en todas las especies de peces, por lo que los patrones de variación de los marcadores moleculares no pueden ser generalizados. Por otra parte, existe la posibilidad de que las secuencias de la RC amplificadas en este trabajo (RCA-RCE), corresponden a una zona conservada dentro del mismo fragmento. De acuerdo con Lee *et*

al. (1995), el segmento amplificado para *E. puncticulatus* no cubre en su totalidad la RC (Fig. 21), por lo que la utilización de primers adicionales (RCC-RCD) ampliarían una sección de la RC que podría mostrar mayor variación.

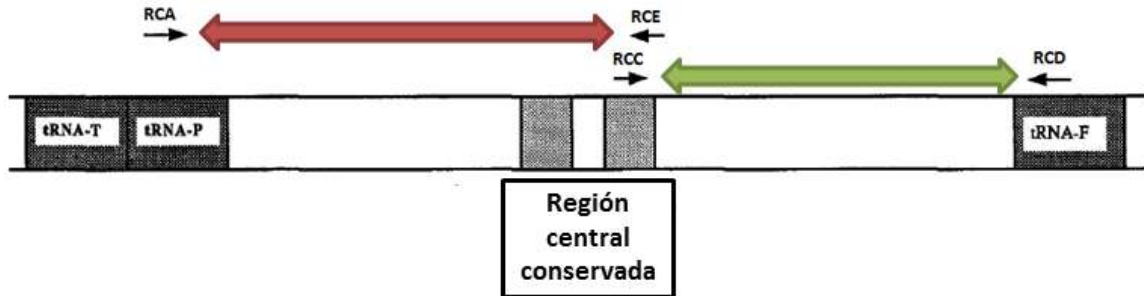


Figura 21. Descripción gráfica de la Región Control. Las flechas en rojo indican el segmento obtenido mientras que las flechas en verde señalan un segmento adicional que no fue amplificado.

Comparando la diversidad genética entre provincias, los resultados no fueron consistentes, siendo la Provincia Mexicana, la que mostró mayores valores de diversidad genética para Cytb y S7, mientras que la Provincia Panámica fue la que resultó con mayores valores para la RC y la Rho. La Provincia de Cortés en cambio presentó una diversidad genética menor en los cuatro marcadores moleculares. Las curvas de rarefacción de haplotipos utilizadas para comparar la diversidad genética (Fig. 8), mostraron que la Provincia de Cortés presenta una menor diversidad que la Mexicana. La Provincia Panámica registró valores intermedios de diversidad respecto a las otras dos provincias. Las estimaciones de la diversidad genética pueden estar influenciadas por el tamaño poblacional, el flujo genético y por el efecto de procesos históricos. Usualmente, las poblaciones con reducido flujo génico presentan una baja diversidad genética. Por lo que, el hecho de que la Provincia Mexicana tenga valores más altos de diversidad que la provincia de Cortes podría ser resultado de una restricción, al menos unidireccional del flujo genético entre las poblaciones de ambas provincias. La evidencia de este patrón son los organismos encontrados en la Provincia Mexicana cercanamente relacionados de la Provincia de Cortés e incluso compartiendo haplotipos. Por el contrario, no se encontraron organismos en la Provincia de Cortés cercanamente relacionados con la Provincia Mexicana. Esta explicación se detalla más adelante con base a los resultados obtenidos mediante los análisis filogenéticos y filogeográficos. Asimismo, se proponen los factores oceanográficos y los escenarios históricos que podrían influir en esta restricción de flujo genético.

### Demografía histórica y expansión poblacional

La D de Tajima no rechazó el modelo neutral para el total de las secuencias de Cytb ( $D=-0.674$ ,  $P=0.278$ ), sin embargo la F de Fu fue significativamente negativa ( $F=-24.173$ ,  $P=0.001$ ) para el total de los datos, para todas las provincias y para la mayoría de las poblaciones (Tabla 5). Estas desviaciones indican un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, lo cual se ha reportado previamente para el ADNmt en otras especies de peces marinos (Craig *et al.*, 2006; Gaither *et al.*, 2011). Los valores negativos indican un predominio de haplotipos únicos y puede relacionarse con una posible expansión poblacional reciente. Por su parte, la Distribución Mismatch no se ajustó al modelo esperado para una población de tamaño constante, mostrando valores bajos de  $r$  y  $R^2$  (Tabla 9 y Fig. 13). Se ha encontrado en varios casos, que las pruebas más eficientes para detectar crecimiento poblacional son la F de Fu y la  $R^2$  de Ramos-Onsis y Rozas. La F de Fu es más sensible a la presencia de conjuntos de un solo elemento en una muestra y está diseñada específicamente para detectar expansión poblacional. Por su parte, la  $R^2$  tiene un mayor poder estadístico en tamaños de muestra pequeños mientras que la F de Fu funciona mejor en muestras de mayor tamaño (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Aunado a esto, la forma de “estrella” de las redes de haplotipos (Fig. 10) y la alta diversidad haplotípica ligada a una baja diversidad nucleotídica (Tabla 4), sugieren la presencia de un evento de expansión demográfica posterior a un cuello de botella poblacional. Las reducciones poblacionales en peces arrecifales son producto de perturbaciones de hábitat causadas por la disminución del nivel del océano y fluctuaciones de la temperatura durante el periodo Pleistoceno (Fauvelot *et al.*, 2003). Los organismos arrecifales que habitaban en aguas poco profundas probablemente sufrieron episodios de alteración de su hábitat durante estos periodos, desplazándose a zonas con condiciones favorables. Al retirarse el hielo glacial, la expansión poblacional dio como resultado una gran abundancia de haplotipos de baja frecuencia (Craig *et al.*, 2007; Klanten *et al.*, 2007).

### Inferencia biogeográfica

Los resultados de los análisis filogenéticos mostraron la existencia de dos clados principales (Fig. 9, 15, 17, 19), uno que corresponde a todas las poblaciones muestreadas en las Provincias Mexicana y de Cortés y otro compuesto por las poblaciones de la Provincia Panámica. De igual manera, las redes de haplotipos identificaron dos haplogrupos (Fig. 10, 16, 18 y 20) consistentes con los clados encontrados en los análisis filogenéticos. La separación de los haplogrupos de Cytb fue de 22 diferencias nucleotídicas (por encima del

límite de conexión), lo que sugiere historias evolutivas independientes para estos dos grupos. Estos análisis identificaron además, una subdivisión del clado de la Provincia Panámica, identificándose dos haplogrupos, uno perteneciente a las muestras recolectadas en Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y otras a las recolectadas en Ecuador, separándose por seis diferencias nucleotídicas. A diferencia de los análisis filogeográficos previos en peces costeros (Muss *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2006; Saarman *et al.*, 2010) los índices de  $F_{ST}$  (Tabla 6) indicaron una significativa diferenciación genética (0.863-0.967) entre el grupo de poblaciones de las Provincias de Cortés y Mexicana con respecto a las de la Provincia Panámica. Los índices de diferenciación  $F_{ST}$  estimados entre las poblaciones de Centroamérica y Ecuador fueron de 0.858 a 0.875. De manera independiente el AMOVA y el SAMOVA encontraron la máxima variación (88.23%), en el arreglo de tres grupos que divide a las poblaciones de las Provincias De Cortés y Mexicana, las de Centroamérica y la de Ecuador, en tres conjuntos independientes (Tablas 7 y 8). En este sentido, ambas pruebas resultaron igualmente eficientes en detectar la mayor variación entre grupos, con la diferencia que el SAMOVA no requirió la designación *a priori* de los grupos.

Una primera teoría que explicaría los patrones de estructura genética de *Elacatinus puncticulatus* se relaciona con las discontinuidades de hábitat. Sin embargo, análisis moleculares en otros taxones de peces arrecifales no han encontrado patrones filogeográficos influidos por las brechas arenosas ni evidencia de estructura genética correspondiente a las provincias biogeográficas continentales del POT (e.g. *Ophioblennius steindachneri*, Muss *et al.*, 2001; *Epinephelus labriformis*, Craig *et al.*, 2006). En contraste, los resultados obtenidos para *E. puncticulatus*, sugieren la existencia de factores adicionales involucrados en la estructuración genética de las poblaciones (Taylor y Hellberg, 2003). Debido a las características descritas de la especie, se infiere que estos factores se relacionan con (a) mecanismos de retención local de larvas y (b) atributos etológicos que influyen en la capacidad de evitar o formar parte de estos mecanismos. Los principales mecanismos físicos involucrados en la retención local de las larvas pelágicas obedecen a la dinámica oceanográfica costera. En los ambientes marinos, las corrientes pueden ser complejas y los procesos oceanográficos como giros y frentes tienen la capacidad de influir en la dispersión de las larvas (Weersing y Toonen, 2009). Existen casos en los que dos poblaciones adyacentes no comparten migrantes si se encuentran separadas por un frente oceanográfico (Gilg y Hilbish, 2003), en cambio, dos poblaciones distantes pueden estar conectadas por corrientes que circulan entre ellas (Mitarai *et al.*, 2009). La influencia de los giros de mesoescala en los patrones de desplazamiento de las larvas ha sido registrado

anteriormente, causando la concentración y retención de grandes biomásas de peces (Aceves-Medina *et al.*, 2004). Con base en esta información, la diferenciación genética encontrada entre provincias y entre Centroamérica y Ecuador, donde no existen discontinuidades de hábitat, sugiere fenómenos de aislamiento para *E. puncticulatus* ocasionados por procesos oceanográficos persistentes que han actuado en diferentes escalas de tiempo. De acuerdo con esto, la estructura filogeográfica encontrada entre la Provincia Mexicana y la Provincia Panámica estaría determinada por la formación de giros, resultado de las interacciones atmosférico-oceanográficas que ocurren entre las costas del Golfo de Tehuantepec y el Golfo de Papagayo (Fig. 4). Los giros oceánicos evitarían la dispersión de las larvas mientras que las discontinuidades de hábitat dificultarían su establecimiento, lo que en conjunto generaría una eficiente barrera entre ambas regiones. Por su parte, la división entre los haplotipos de Centroamérica y Ecuador, involucraría giros formados por chorros de viento que atraviesan Panamá y giros formados por mecanismos de vorticidad e inestabilidad resultado de la convergencia entre la Contra Corriente Ecuatorial del Norte (CCEN), la Corriente Costera de Costa Rica (CCCR) y la Corriente Ecuatorial del Sur (CES) (Fig. 22). Aunque se esperaría una mayor conexión entre las poblaciones de la Provincia Mexicana y Centroamérica, la red haplotipos mostró una mayor relación entre la Provincia Mexicana y Ecuador. La dispersión de organismos entre ambas regiones solamente sería posible evitando la retención de los giros, al desplazarse por zonas externas o entre la convergencia de estas formaciones. La ruta que pudieron seguir los organismos que conectaron ambas regiones no es clara, pero probablemente se relaciona con procesos históricos que facilitaron la dispersión entre ambas regiones. Esta conexión temporal, posiblemente ocurrió debido a eventos de variación en los patrones de corrientes que no corresponden a la dinámica oceánica contemporánea. De acuerdo con la estimación de los tiempos de divergencia, la división entre las poblaciones de las Provincias Mexicana y Panámica (313-873 mil años) y entre Centroamérica y Ecuador (75-300 mil años) posiblemente ocurrió durante el Pleistoceno Medio (130-780 mil años) (Cohen *et al.*, 2012). La información paleoceanográfica muestra que los patrones de transferencia de calor de las corrientes del Pacífico han variado de forma repetitiva durante el Pleistoceno (Lea *et al.*, 2002). Junto con la inestabilidad en el nivel del océano, la variabilidad espacial y temporal en los patrones de transferencia de calor en el océano, pudieron generar alteraciones de hábitat responsables del desplazamiento y reducción de poblaciones de peces arrecifales (Pisias y Mix, 1997). Los cambios en las condiciones climáticas o variaciones en los patrones de corrientes pudieron aislar a las poblaciones por periodos suficientes para generar

diferenciación alopátrica (Valentine y Jablonski, 1983). La posterior recolonización de los hábitats pudo fortalecer la diferenciación genética debido al efecto fundador (Mayr, 1947) reforzado por la adaptación ecológica. Esto indicaría que la estructura genética de *E. puncticulatus* es el resultado de la combinación de procesos históricos y contemporáneos que han influido en el establecimiento de linajes evolutivos independientes y en el mantenimiento de estos linajes.

Finalmente, la diferenciación genética baja pero significativa entre las poblaciones de las Provincia de Cortés y Mexicana, evidenciaron una restricción (al menos unidireccional) del flujo genético. Esto podría ser resultado de la retención y dispersión ocasionada por giros y surgencias generados por la convergencia de tres sistemas oceánicos: el Sistema de la Corriente de California, el Sistema del Pacífico Tropical del Este y la masa de agua del Golfo de California (Pantoja *et al.*, 2012). En esta zona, la confluencia superficial de masas de agua de origen subártico trasladadas por la Corriente de California (CC), aguas superficiales ecuatoriales desplazadas por la Corriente Costera Mexicana (CCM) y aguas con alta salinidad originadas en el Golfo de California (CGC), intensifican la formación de giros y afloramientos de mesoescala (Zamudio *et al.*, 2007; Pantoja *et al.*, 2012). La separación de la costa de la CCM junto con la convergencia de la CCM y la CGC presente durante todo el año, son los principales mecanismos involucrados en la formación de giros (Fig. 23). La desviación de la CCM podría ser responsable de transportar lejos de la costa a las larvas de *Elacatinus puncticulatus* provenientes de la Provincia Mexicana, mientras que las contracorrientes y giros que ocurren en esta zona no impedirían la dispersión de individuos de la P. de Cortés hacia la P. Mexicana.

Los mecanismos de retención que ocurren entre las Provincias Mexicana y Panámica, así como los que se ubican entre Centroamérica y Ecuador, impiden de manera persistente el intercambio de individuos. Por el contrario, entre la Provincia de Cortés y la Mexicana, estos mecanismos son menos eficientes y permiten el flujo genético de norte a sur entre poblaciones. Sin embargo, como consecuencia de esta conectividad se esperaría una homogenización genética (Avise *et al.*, 1979), la cual no ha sido observada en los resultados obtenidos con Cytb. Esto podría ser efecto de un proceso de aislamiento reproductivo reciente, que no ha sido detectado por el ADNn debido a que la deriva génica es más lenta en los loci nucleares (Palumbi *et al.*, 2001). Probablemente entre estas dos regiones persistió un aislamiento por suficiente tiempo para que se generara diferenciación alopátrica. Una vez que las condiciones ambientales permitieron nuevamente la conexión entre ambas provincias, la diferenciación reforzada por la adaptación ecológica (e. g. diferencias en

hábitat y comportamiento) y el apareamiento selectivo (e. g. reconocimiento de pareja por coloración) evitaron la hibridación entre ambas poblaciones, reteniendo la integridad genética y reproductiva (McMillan *et al.*, 1999; Streelman *et al.*, 2003; McKinnon *et al.*, 2004).

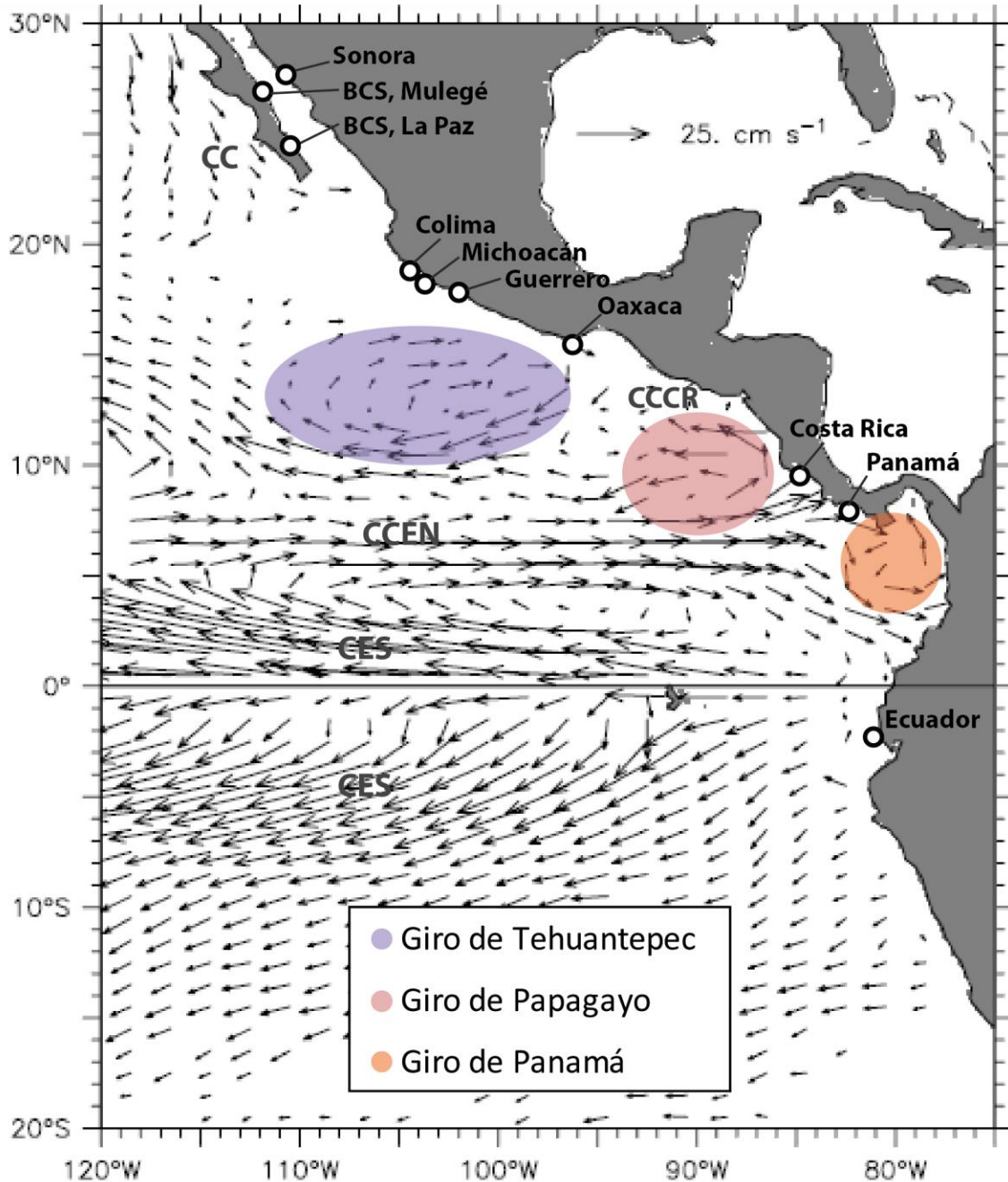


Figura 22. Ubicación de las 10 poblaciones muestreadas de *Elacatinus puncticulatus*. Las áreas coloreadas representan tres de los principales giros de mesoescala que ocurren en el POT. Las flechas indican la circulación promedio superficial de las corrientes oceánicas. La escala de las flechas se localiza en el Golfo de México. CC: Corriente California, CCCR: Corriente Costera de Costa Rica, CCEN: Contra Corriente Ecuatorial del Norte, CES: Corriente Ecuatorial del Sur. Modificado de: Kessler, 2006.

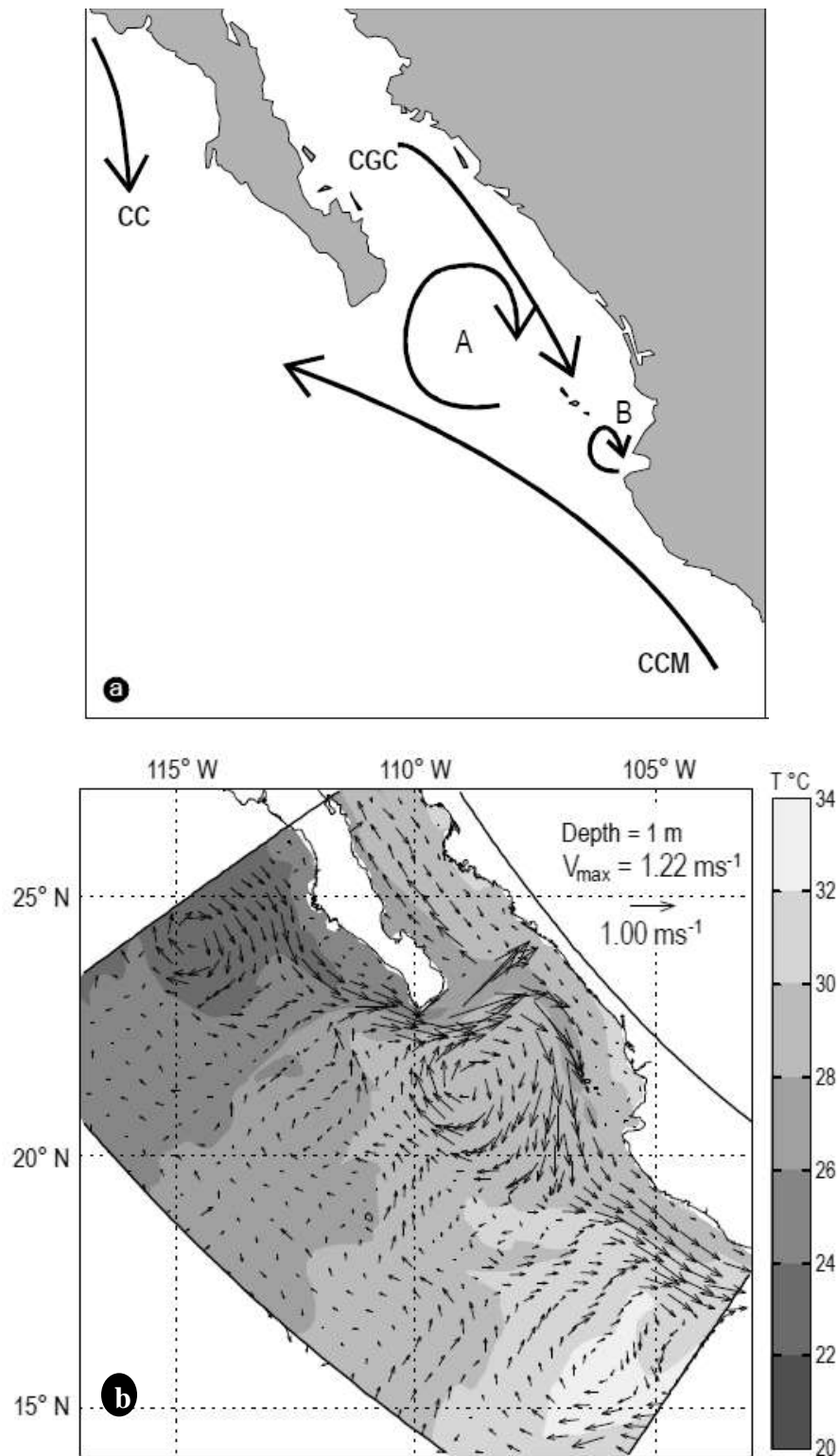


Figura 23. a. Patrones de circulación oceánica durante la formación de giros, formados por contracorrientes en la entrada al golfo de California. A y B: Giros anticiclónicos. CGC: corrientes del golfo de California, CC: corriente de California y CCM: corriente costera mexicana. b. Temperatura de superficie del océano y vectores de fuerza registrados el 27 de mayo de 2004. Fuente: Pantoja *et al.*, 2012.



La variación entre los patrones filogeográficos de *Elacatinus puncticulatus* y otras especies de peces marinos que habitan en similares ámbitos de distribución (Muss *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2006), implica diferentes escenarios de dispersión. Considerando los giros como mecanismos de retención, la ausencia de estructura genética en otras especies de peces arrecifales, involucraría características relacionadas con la estacionalidad en los periodos de reproducción y con la capacidad natatoria, más que con la duración de la larva pelágica como se había sugerido anteriormente. La sincronización de los periodos reproductivos junto con la presencia de surgencias y afloramientos, es una estrategia que implica el aprovechamiento de los recursos asociados al incremento de la productividad primaria (Blanton *et al.*, 1987; Jennings *et al.*, 2001; Bakun, 2006). Se desconoce la temporada exacta de reproducción de *E. puncticulatus* pero posiblemente el máximo reproductivo, coincide con la época en que los giros y surgencias presenta una mayor incidencia por lo que las larvas de esta especie serían retenidas por los giros oceánicos. Esto concordaría con la observación de machos en fase reproductiva durante inmersiones de equipo de trabajo realizadas a finales del verano. Debido a que los giros presentan una mayor incidencia y magnitud durante otoño e invierno, las especies con reproducción durante otras temporadas del año sufrirían una menor influencia de los giros. Por otra parte, la capacidad de natación relacionada con la talla de la larva y los movimientos verticales en la columna agua tienen un efecto significativo en el transporte. Al modificar su distribución en la columna de agua nadando verticalmente, las larvas pueden encontrar diferentes corrientes, lo que puede conducir a la retención o la propagación (Levin, 2006; Pineda *et al.*, 2007). Se han registrado diversos patrones de estructura genética en especies del género *Elacatinus* que habitan en el Caribe, provenientes de las mismas localidades y que presentan fases de larva pelágica con duración similar. De acuerdo con Taylor y Hellberg (2003) el grado de dispersión o retención entre especies se debe a medios físicos o de comportamiento (o la combinación de ambos) que determinan su capacidad de evitar o formar parte de las corrientes oceánicas. En este sentido, especies con periodos de reproducción no invernales y/o que presentan larvas con gran capacidad natatoria (horizontal o vertical) no mostrarían influencia en su estructura genética de ninguno de los procesos oceanográficos mencionados. Como resultado, la variación en los patrones de estructura genética entre *E. puncticulatus* y otras especies arrecifales, estaría determinada por las características de motilidad de la larva y los periodos de reproducción. Craig *et al.* (2006) mencionan mecanismos de retención de larvas que limitan el flujo genético de *E. labriformis* y *E. clippertonensis* entre el Atolón de Clipperton y el resto del POT, relacionados con corrientes

que rodean la isla. Incluso, señalan que: “corrientes de remolino provenientes de las islas, pueden devolver a las larvas a su sitio natal”. Sin embargo, no consideran a las corrientes como disruptivos biogeográficos que conducirían a la diferenciación genética de poblaciones del POT continental. Por esta razón, este trabajo representa una primera aproximación que identifica los giros oceánicos de mesoescala como barreras biogeográficas, implicadas en el mantenimiento de los patrones de diferenciación genética.

### **Implicaciones taxonómicas**

Hasta la realización de este trabajo no existen descripciones sobre la existencia de subespecies de *E. puncticulatus*. Los resultados de los análisis de secuencias de ADNmt y ADNn, revelaron la división genética que separa las poblaciones de las Provincias de Cortés y Mexicana de la Provincia Panámica, lo que indica la restricción del flujo genético entre ambas regiones. Las distancias genéticas entre estas poblaciones fueron de entre 2.17 y 2.23% para Cytb, superior al mínimo reportado para especies hermanas del género *Elacatinus* (1.27%) (Taylor y Hellberg, 2005) y similar al reportado por John y Avise (1998) para peces (2.6%). Las distancias de Rho encontradas del 0.20%, superan el mínimo estimado del 0.13% para taxones hermanos de *Elacatinus* (Taylor y Hellberg, 2005). En este sentido, la evidencia obtenida sugiere la existencia de un complejo de dos especies que integraría *E. puncticulatus*. Los análisis de datos moleculares son una aproximación válida para determinar los límites entre especies cercanamente relacionadas, sin embargo, sería necesario realizar posteriores estudios con datos morfológicos y/o merísticos para respaldar esta hipótesis.

### **Conservación**

Las amenazas para los ambientes marinos causadas por efecto de actividades antropogénicas (sobrepesca, pérdida de hábitat, extracción de especies) han originado el desarrollo de alternativas de manejo para poblaciones y ecosistemas. Las estrategias de conservación se encuentran en transición al implementar modelos que tienen como objetivo conservar ecosistemas como una alternativa a la conservación de especies de manera individual (Hughes *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 2012). Las reservas marinas son consideradas como una herramienta para proteger la biodiversidad mediante el resguardo de zonas específicas. Sin embargo, para el diseño óptimo de reservas marinas es necesario determinar los límites de distribución de especies y el grado de conectividad de sus

poblaciones; incluso, las decisiones de manejo deben tomar en cuenta la historia evolutiva reciente (Palumbi, 2003). El presente estudio representa una perspectiva de los patrones de flujo genético y los límites genéticos entre poblaciones de una especie arrecifal. Aunque no es posible generalizar los patrones de estructura genética en otras especies, estos datos pueden ser aplicados en decisiones de manejo dentro del POT, por ejemplo al tomar en cuenta la diversidad genética, los patrones de conectividad y la división de los clados y haplogrupos. Las poblaciones aisladas, pueden ser consideradas como entidades individuales, por lo que la designación de reservas marinas debería integrar en unidades independientes a las poblaciones de la Provincia de Cortés, la Provincia Mexicana, Centroamérica y Ecuador.

## VII. CONCLUSIONES

1. *Elacatinus puncticulatus* presenta una diversidad genética alta considerando los valores registrados para peces arrecifales. Los valores de diversidad obtenidos para Citocromo b fueron notablemente mayores a los de Rodopsina, S7 y Región Control. La Provincia Mexicana y la Provincia Panámica mostraron una mayor diversidad en comparación con la Provincia de Cortés.
2. En *Elacatinus puncticulatus*, la Región Control fue menos variable que Citocromo b, debido a que la hipervariabilidad de la Región Control probablemente no es consistente en todas las especies de peces. Existe además la posibilidad de que las secuencias de la Región Control amplificadas, corresponden a una zona conservada dentro del mismo fragmento.
3. Las desviaciones negativas significativas, junto con los valores bajos de  $r$  y  $R^2$ , la forma de “estrella” de las redes de haplotipos y la alta diversidad haplotípica ligada a una baja diversidad nucleotídica evidenciaron la presencia de un evento de expansión demográfica posterior a un cuello de botella poblacional. Esto puede ser resultado de la reducción poblacional producto de perturbaciones de hábitat causadas por la disminución del nivel del océano y fluctuaciones de la temperatura durante el periodo Pleistoceno
4. Los resultados de los análisis filogenéticos junto con las redes de haplotipos, los índices de  $F_{ST}$ , el AMOVA y el SAMOVA, identificaron un patrón de estructura genética maximiza la separación de las muestras en tres grupos: (1) Provincias de Cortés y Mexicana, (2) Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y (3) Ecuador. Además, se evidenció una restricción unidireccional del flujo genético entre las Provincias de Cortés y Mexicana. Estos resultados sugieren fenómenos de aislamiento para *E. puncticulatus* ocasionados por procesos oceanográficos persistentes que han actuado en diferentes escalas de tiempo. La estructura filogeográfica encontrada estaría determinada por la formación de giros, resultado de las interacciones atmosférico-oceanográficas que ocurren entre las costas de Centroamérica, así como giros y surgencias formados por mecanismos de vorticalidad e inestabilidad resultado de la convergencia de corrientes y sistemas oceánicos. Aunado a las discontinuidades de hábitat, los giros oceánicos dificultarían la dispersión y el establecimiento de la larva pelágica, lo que en conjunto generaría una eficiente barrera para el flujo genético entre poblaciones.

5. La falta de homogenización genética entre las Provincias de Cortés y Mexicana podría ser efecto de un proceso de aislamiento reproductivo reciente, resultado de la diferenciación alopátrica. La diferenciación reforzada por la adaptación ecológica y el apareamiento selectivo han evitado la homogenización genética entre ambas poblaciones ante un contacto secundario.
6. La estimación de los tiempos de divergencia indica que la división entre las poblaciones de las Provincias Mexicana y Panámica (313-873 mil años) y entre Centroamérica y Ecuador (75-300 mil años) posiblemente ocurrió durante el Pleistoceno Medio (130-780 mil años).
7. Se infirió que la existencia de patrones de estructura genética en *Elacatinus puncticulatus* a diferencia de otras especies de peces arrecifales, involucraría características relacionadas con la estacionalidad en los periodos de reproducción y con la capacidad natatoria, más que con la duración de la larva pelágica.
8. Los resultados obtenidos sugiere la existencia de un complejo de dos especies que integraría *Elacatinus puncticulatus*, lo cual sería aceptado o rechazado mediante el análisis de datos morfológicos y/o merísticos que evaluarían esta hipótesis.
9. El análisis de los patrones filogeográficos de *Elacatinus puncticulatus* representa una perspectiva del flujo y límites genéticos entre poblaciones de una especie arrecifal. Estos datos pueden ser aplicados en decisiones de manejo dentro del POT, por ejemplo al tomar en cuenta la diversidad genética, el grado de conectividad y la división de los clados y haplogrupos. Las poblaciones aisladas, pueden ser consideradas como entidades individuales, por lo que la designación de reservas marinas debería integrar en unidades independientes a las poblaciones de la Provincia de Cortés, la Provincia Mexicana, Centroamérica y Ecuador.

**VIII. LITERATURA CITADA**

- Acal, D. E. 1991. Abundancia y diversidad del ictioplancton en el Pacífico Centro de México. Abril 1981. *Ciencias Marinas* 17:25-50.
- Aceves-Medina, G., S. P. A. Jiménez-Rosenberg, A. Hinojosa-Medina, R. Funes-Rodríguez, R. J. Saldierna-Martínez y P. E. Smith. 2004. Fish larvae assemblages in the Gulf of California. *Journal of fish biology* 65(3):832-847.
- Aceves-Medina, G., R. Palomares-García, J. Gomez-Gutierrez, C. J. Robinson y R. J. Saldierna-Martínez. 2009. Multivariate characterization of spawning and larval environments of small pelagic fishes in the Gulf of California. *J. Plankton Res.* 31:1283-1297.
- Avice, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology Systematics* 18:489-522.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography. The History and Formation of Species*. Boston, MA: Harvard University Press.
- Ayala-Duval, E., M. C. Maldonado-Monroy, J. A. Becerril-Martínez, D. T. García-Tamayo, C. Juárez-Ortiz, J. Blas-Cabrera, V. Barrios-Orozco, J. A. Huerta-González, A. Almaráz-Gómez. 1998. Distribución de algunos componentes del ictioplancton y su relación con la biomasa zooplanctónica. En: M. Tapia-García (Ed.), *El Golfo de Tehuantepec: el ecosistema y sus recursos*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, pp. 93–102.
- Bakun, A., 2006. Fronts and eddies as key structures in the habitat of marine fish larvae: opportunity, adaptive response and competitive advantage. *Scientia Marina* 70(S2):105–122.
- Beerli, P. 2003. MIGRATE: A maximum likelihood program to estimate gene flow using the coalescent, Tallahassee/Seattle.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. 2010. GenBank. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1):D46-D51.
- Bermingham, E. y H. A. Lessios. 1993. Rate variation of protein and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2734–2738.
- Blanton, J. O., K. R. Tenore, F. Castillejo, L. P. Atkinson, F.B. Schwing y A. Lavin. 1987. The relationship of upwelling to mussel production in the rias on the western coast of Spain. *Journal of Marine Research* 45:497-511.
- Bonjean, F. 2001. Influence of surface currents on the sea surface temperature in the tropical Pacific. *J. Phys. Oceanogr.* 31:943-961.

- Breitburg, D. L., M. A. Palmer y T. Loher. 1995. Larval distributions and the spatial patterns of settlement of an oyster reef fish: responses to flow and structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 125:45-60.
- Briggs, J. C. 1974. *Marine zoogeography*. McGraw-Hill, New York, NY.
- Brown, W. M., M. George Jr. y A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 1967–1971.
- Carr, H. M. 1991. Habitat selection and recruitment of an assemblage of temperate zone reef fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 146:113-137.
- Castro, L.R., G.R. Salinas y E. H. Hernández. 2000. Environmental influences on winter spawning of the anchoveta *Engraulis ring-ens* off central Chile. *Mar. Ecol., Progr. Ser.* 197:247–258.
- Chakrabarty, P. 2006. Systematics and historical biogeography of Greater Antillean Cichlidae. *Molecular phylogenetics and evolution* 39(3):619-627.
- Chelton, D.B., M. H. Freilich y S. K. Esbensen. 2000. Satellite observations of the wind jets off the Pacific coast of Central America. Parte I y II: Regional relationships and dynamical considerations. *Monthly Weather Review* 128:2019–2043.
- Chelton, D.B., M. G. Schlax, M. H. Freilich y R. F. Milliff. 2004. Satellite measurements reveal persistent small-scale features in ocean winds. *Science* 303:978–983.
- Chen, W. J., C. Bonillo y G. Lecointre. 2003. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:262-288.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659.
- Coates, A.G., D. F. McNeill, M. P. Aubry, W. A. Berggren, L. S. Collins. 2005. An introduction to the geology of the Bocas del Toro archipelago, Panama. *Caribbean J. Sci.* 41:374–91.
- Cohen, K. M., S. Finney y P. L. Gibbard. 2012. International chronostratigraphic chart. <<http://www.stratigraphy.org/ics%20chart/ChronostratChart2012.pdf>>.
- Colwell, R. K. 1999. EstimateS. Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9.1.1.
- Colwell, R. K., C. X. Mao y J. Chang. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* 85:2717-2727
- Colwell, R. K., A. Chao, N. J. Gotelli, S.-Y. Lin, C. X. Mao, R. L. Chazdon, y J. T. Longino. 2012. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology* 5:3-21.

- Cowen, R. K. y Sponaugle S. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1:443-466.
- Craig, M. T., P. A. Hastings, D. J. Pondella, D. R. Robertson y J. A. Rosales-Casián. 2006. Phylogeography of the Flag cabrilla, *Epinephelus labriformis* (Serranidae): implications for the biogeography of the Tropical Eastern Pacific and the early stages of speciation in a marine shore fish. *Journal of Biogeography* 33:969-979.
- Craig, M. T., J. A. Eble, B. W. Bowen, y D. R. Robertson. 2007. High genetic connectivity across the Indian and Pacific Oceans in the reef fish *Myripristis berndti* (Holocentridae). *Marine Ecology Progress Series* 334(3):245-254.
- Domínguez-Domínguez, O. y E. Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32(1):59-70.
- Dowling, T. E., A. C. Tibbetts, W. L. Minckley y G. R. Smith. 2002. Evolutionary relationships of the Plagopterins (Teleostei: Cyprinidae) from Cytochrome b sequences. *Copeia* 2002:665-678.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro y O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22:1185-1192.
- Drummond, A. J. y A. Rambaut. 2007. BEAST v1.4.7.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro y O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22:1185-1192.
- Drummond, A. J. y A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, De Couet HG. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology* 15:2239-2251
- Dupanloup, I., S. Schneider y L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11(12):2571-81.
- Eschmeyer, W. N. 1998. *Catalog of fishes*. Vol. 3. California Academy of Sciences, San Francisco, CA.
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes -application to human mitochondrial- DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fauvelot, C., Bernardi, G., y 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* 57(7): 1571-1583.



- Fernández-Álamo, M.A., 1987. Distribución y abundancia de los Poliquetos pelágicos (Annelida-Polychaeta) en el Golfo de Tehuantepec, México. In: Gómez-Aguirre, S., Arenas-Fuentes, V. (Eds.), Contribuciones en Hidrobiología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 269–278.
- Fernández-Álamo, M. A., J. Färber-Lorda. 2006. Zooplankton and the oceanography of the Eastern Tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography* 69(2–4):318–359.
- Fiedler, P. C. 2002. The annual cycle and biological effects of the Costa Rica Dome. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 49(2):321-338.
- Fiedler, P.C. y M. F. Lavín. 2006. Introduction: A review of Eastern Tropical Pacific Oceanography. *Progress in Oceanography* 69(2–4):94–100.
- Floeter, S. R., Rocha, L. A., Robertson, D. R., Joyeux, J. C., Smith-Vaniz, W. F., Wirtz, P., A. J. Edwards, J. P. Barreiros, C. E. L. Ferreira, J. L. Gasparini, A. Brito, J. M. Falcón, B. W. Bowen y G. Bernardi. 2008. Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 35(1): 22-47.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fu, Y. X. 1996. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 143:557–570.
- Galindo, H. M., A. S. Pfeiffer-Herbert, M. A. McManus, Y. Chao, F. Chai, S. R. Palumbi. 2010. Seascape genetics along a steep cline: using genetic patterns to test predictions of marine larval dispersal. *Molecular Ecology* 19:3692-3707.
- Gilg, M. R. y T. J. Hilbish. 2003. The geography of marine larval dispersal: coupling genetics with fine-scale physical oceanography. *Ecology* 84:2989–2998.
- Ginsburg, I. 1938. Two new gobiid fishes of the Genus *Gobiosoma* from Lower California. *Stan. Ichthyol. Bull.* 1(2):57-59.
- Glynn, P.W. y Ault, S.J. 2000. A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. *Coral Reefs* 19:1–23.
- Harmelin-Vivien, M. L, Harmelin, J. G, y Lebourleux, V., 1995. Microhabitat requirements for settlement of juvenile sparid fishes on Mediterranean rocky shores. *Hydrobiologia*, 300/301: 309-320.
- Harpending, H. C., S. T. Sherry, A. R. Rogers, y M. Stoneking. 1993. Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthr.* 34:483–496.
- Harrison, H.B., D.H. Williamson, R.D. Evans, G.R. Almany, S.R. Thorrold, G.R. Russ, K.A. Feldheim, L. van Herwerden, S. Planes, M. Srinivasan, M. L. Berumen y G. P. Jones. 2012. Larval export from marine reserves and the recruitment benefit for fish and fisheries. *Curr. Biol.* 22:1023–1028.

- Hastings, W. 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57:97-109.
- Hastings, P. A. 2000. Biogeography of the tropical eastern Pacific: Distribution and phylogeny of chaenopsid fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 128: 319-335.
- Heist, E. J. 2004. Genetics of sharks, skates, and rays. In: *Biology of Sharks and Their Relatives* (eds Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR), pp. 471–485. CRC Press, New York.
- Hellberg, M. E., R. S. Burton, J. E. Neigel y S. R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70(1):273-90.
- Huelsenbeck, J. P. y F. R. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian estimation of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Hughes, T. P., D. R. Bellwood, C. Folke, R. S. Steneck y J. Wilson. 2005. New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. *Trends in ecology and evolution*, 20(7):380-386.
- Jennings, S., M. J. Kaiser y J. D. Reynolds. 2001. *Marine Fisheries Ecology*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Johannes, R. E. 1978. Reproductive strategies of coastal marine fishes in the tropics. *Environmental Biology of Fishes* 3:65-84.
- Johns, G. C. y J. C. Avise. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15(11), 1481-1490.
- Johnstone, K. A., Marshall, H. D., y S. M. Carr. 2007. Biodiversity genomics for species at risk: patterns of DNA sequence variation within and among complete mitochondrial genomes of three species of wolffish (*Anarhichas* spp.). *Canadian journal of zoology*, 85(2), 151-158.
- Keen, A. M. 1971. *Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. 2nd ed. Stanford Univ. Press, Stanford, Calif.
- Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography* 69:181–217.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Klanten, O. S., J. H. Choat y L. van Herwerden. 2007. Extreme genetic diversity and temporal rather than spatial partitioning in a widely distributed coral reef fish. *Marine Biology* 150(4):659-670.
- Larhammar, D., y C. Risinger. 1994. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1:59–68.
- Lavery, S., C. Moritz y D. R. Fielder. 1995. Changing patterns of population structure and gene flow at different spatial scales in *Birgus latro* (the coconut crab). *Heredity* 74: 531-541.

- Lavín, M. F., E. Beier, J. Gómez-Valdés, V. M. Godínez, y J. García. 2006. On the summer poleward coastal current off SW México. *Geophysical Research Letters* 33(2): L02601.
- Lessios, H. A. 2008. The Great American Schism: Divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus *Annual Reviews of Ecology Evolution and Systematics* 39: 63–91
- Lea, D. W., D. K. Pak y H. J. Spero. 2000. Climate impact of late Quaternary equatorial Pacific sea surface temperature variations. *Science* 289(5485):1719-1724.
- Lee, W. J., J. Conroy, W. H. Howell y T. D. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control region. *Journal of Molecular Evolution* 41: 54–66.
- Levin, L. A. 2006. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integr. Comp. Biol.* 46:282–97
- Lin, H. C., C. Sanchez y P. A. Hastings. 2009. Colour variation is incongruent with mitochondrial lineages: cryptic speciation and subsequent diversification in a Gulf of California reef fish (Teleostei: Blennioidei). *Molecular Ecology* 18: 2476-2488.
- López-Cortés, D. 1990. Distribución de la familia Euphausiidae (Euphausiacea: Crustacea) en el Golfo de Tehuantepec, México. *Revista Biología Tropical* 38, 21–28.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- McKinnon, J. S., S. Mori, B. K. Blackman, L. David, D. M. Kingsley, L. Jamieson, J. Chou y D. Schluter. 2004. Evidence for ecology's role in speciation. *Nature* 429:294–298.
- McMillan, W. O., L. A. Weigt, y S. R. Palumbi. 1999. Color pattern evolution, assortative mating, and genetic differentiation in brightly colored butterflyfishes (Chaetodontidae). *Evolution* 53:247–260.
- Metropolis, N., A. Rosenbluth, M. Rosenbluth, A. Teller, E. Teller. 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemistry and Physics* 21:1087-1092.
- Meyer, A. 1994. Shotcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution*, 9(8):278-280.
- Mitarai, S., D. A. Siegel y K. B. Winters. 2008 A numerical study of stochastic larval settlement in the California Current system. *J. Mar. Syst.* 69:295–309.
- Montgomery J.C., A. Jeffs, S. D. Simpson, M. Meekan y C. Tindle. 2006. Sound as an orientation cue for the pelagic larvae of reef fishes and decapod crustaceans. *Adv. Mar. Biol.* 51:143–96.
- Munk, W. H. 1950. On the wind-driven ocean circulation. *Journal of meteorology*, 7(2):79-93.
- Muss, A., Robertson, D. R., Stepien, C. A., Wirtz, P. y Bowen, B. W. 2001. Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution*, 55(3), 561-572.
- Nathans, J. 1992. Rhodopsin: structure, function, and genetics. *Biochemistry* 31:4923–4931.

- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, USA: Columbia University Press.
- Nei, M. y J. Zhang. 2006. Evolutionary distance: estimation. *Encyclopaedia Life Sci.* 1–3.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*. Wiley, Nueva York. 601 pp.
- Palumbi, S. R. 1992. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 114-118.
- Palumbi, S. R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547-572.
- Palma, S. y S. Rosales. 1995. Composition, distribution and seasonal abundance of macroplankton in Valparaiso Bay. *Investig. Mar. Univ. Catol. Val.* 23: 49-66.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics* (eds D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable), pp. 205–247. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Palumbi, S. R., F. Cipriano y M. P. Hare. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55(5):859-868.
- Palumbi, S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological applications*, 13(Sp1), 146-158.
- Pantoja, D. A., S. G. Marinone, A. Parés-Sierra y F. Gómez-Valdivia. 2012. Numerical modeling of seasonal and mesoscale hydrography and circulation in the Mexican Central Pacific Modelación numérica de la hidrografía y circulación estacional y de mesoescala en el Pacífico central mexicano. *Ciencias Marinas*, 38(2): 363-379.
- Pennington, J.T., K. L. Mahoney, V. S. Kuwahara, D.D. Kolber, R. Calienes y F.P. Chavez. 2006. Primary production in the eastern tropical Pacific: a review. *Progress in Oceanography* 69 (2–4):285–317.
- Pineda, J., J. Hare y S. Sponaugle. 2007. Larval transport and dispersal and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20, 22-39.
- Pisias, N. G. y A. C. Mix. 1997. Spatial and temporal oceanographic variability of the eastern equatorial Pacific during the late Pleistocene: Evidence from Radiolaria microfossils. *Paleoceanography* 12(3):381-393.
- Pondella, D. J. Jr., M. T. Craig, y J. P. C. Franck. 2003. The phylogeny of *Paralabrax* (Perciformes: Serranidae) and allied taxa inferred from partial 16S and 12S mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:176–184.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Ramos-Onsins, S. E. y J. Rozas. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Mol. Biol. Evol.* 19(12):2092–2100.

- Riginos, C. y M. W. Nachman. 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology* 10: 1439-1453.
- Roberts, C. M. 1997. Connectivity and management of Caribbean coral reefs. *Science* 278: 1454–1457.
- Robertson, D. R. y K. L. Cramer. 2009. Shore fishes and biogeographic subdivisions of the Tropical Eastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 380: 1-17.
- Robertson, D. R., Grove, J.S. y McCosker, J. E. 2004. Tropical transpacific shorefishes. *Pacific Science*, 58: 507–565.
- Rocha, L. A., D. R. Robertson, Rocha, C. R., Tassell, J. L., Craig, M. T., y Bowen, B. W. 2005. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*, 14(13), 3921-3928.
- Rosenblatt, R. H. 1967. The zoogeographic relationships of the marine shore fishes of tropical America.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-Del Barrio, X. Messeguer, y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496-4496.
- Saarman, N. P., Louie, K. D., y Hamilton, H. 2010. Genetic differentiation across eastern Pacific oceanographic barriers in the threatened seahorse *Hippocampus ingens*. *Conservation Genetics*, 11(5), 1989-2000.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989 *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schönhuth, S., Hillis, D. M., Neely, D. A., Lozano-Vilano, L., Perdices, A., y Mayden, R. L. 2012. Phylogeny, diversity, and species delimitation of the North American Round-Nosed Minnows (Teleostei: Dionda), as inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 427-446.
- Segura-Puertas, L. 1987. Distribución y abundancia de las Medusas (Cnidaria: Hydrozoa y Scyphozoa) en el Golfo de Tehuantepec, México. In: Gómez-Aguirre, S., Arenas-Fuentes, V. (Eds.), *Contribuciones en Hidrobiología*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 260–267.
- Shulman, M. J. 1985 Recruitment of coral reef fishes: effects of distribution of predators and shelter. *Ecology* 66: 1056–1066.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En: *Ecological Genetics* (Ed. Real LA). Pp. 3-18. Princeton University Press.
- Springer, V. G. 1959. Systematics and zoogeography of the clinid fishes of the subtribe Labrisomini Hubbs. *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas* 5: 417–492

- Stommel, H. 1948. The westward intensification of wind-driven ocean currents. *Trans. Amer. Geophys. Union* 29: 202-206.
- Streelman, J. T., M. Alfaro, M. W. Westneat, D. R. Bellwood y S. A. Karl. 2002. Evolutionary history of the parrotfishes: Biogeography, ecomorphology, and comparative diversity. *Evolution* 56:961–971.
- Swofford, D. L. 2000. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary Relationship of DNA-Sequences in Finite Populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. En: *Mechanisms of Molecular Evolution*. (eds M. Takahata y A.G. Clark), pp. 37-59. Sinauer Associates, Sunderland, M. A.
- Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10(3): 512-526.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor, M. S. y M. E. Hellberg. 2005. Marine radiations at small geographic scales: speciation in Neotropical reef gobies (*Elacatinus*). *Evolution* 59(2): 374-385.
- Taylor, M. S. y M. E. Hellberg. 2006. Comparative phylogeography in a genus of coral reef fishes: biogeographic and genetic concordance in the Caribbean. *Molecular Ecology* 15: 695-707.
- Torres-Hernández, E. 2011. Listado taxonómico de peces crípticos de la costa michoacana. Tesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. 108 p.
- Trasviña, A. y C. A. Andrade. 2002. La circulación costera del Pacífico Tropical Oriental, con énfasis en la Alberca Cálida Mexicana (ACM). *Circulación oceánica y climatología tropical en México y Colombia*, Corcas Editores, Bogotá, 9-37.
- Valentine, J. W., y D. Jablonski. 1983. Speciation in the shallow sea: general patterns and biogeographic controls. Pp. 201–226 In R. W. Sims, J. H. Price y P. E. S. Whalley, eds. *Evolution, time and space: the emergence of the biosphere*. Academic Press, New York.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T., Garrido-Garduño y T. A. Gutiérrez-García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 82(2): 277-297.

- Victor, B. C. y G. M. Wellington. 2000. Endemism and the pelagic larval duration of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 205: 241-248.
- Viesca-Lobatón, C., E.F. Balart, A. González-Cabello, I. Mascareñas-Osorio, O. Aburto-Oropeza, H. Reyes-Bonilla, E. Torreblanca. 2008. Peces arrecifales. In: Danemann GD, Ezcurra E (eds.), Bahía de Los Ángeles: Recursos Naturales y Comunidad. Pronatura Noroeste A.C., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, San Diego Natural History Museum. México DF, pp. 385–427.
- Walker, B. W. 1960. The distribution and affinities of the marine fish fauna of the Gulf of California. *Systematic Zoology* 9: 123-133.
- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7:256-276.
- Weersing, K. y R. J. Toonen. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 393:1–12.
- White, C., K. A. Selkoe, J. Watson, D. A. Siegel, D. C. Zacherl, y R. J. Toonen. 2010. Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1688):1685-1694.
- Willett, C.S., R.R. Leben y M. Lavín. 2006. Eddies and tropical instability waves in the eastern tropical Pacific: A review. *Progr. Oceanogr.* 69:218-238.
- Willis, T. J. 2001. Visual census methods underestimate density and diversity of cryptic reef fishes. *Journal of Fish Biology* 59: 1408-1411.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wyrtki, K. 1981. An estimate of equatorial upwelling in the Pacific. *American Meteorology Society*, 11: 1205-1214.
- Xie, S. P., H. Xu, W. S. Kessler, y M. Nonaka. 2005. Air-Sea Interaction over the Eastern Pacific Warm Pool: Gap Winds, Thermocline Dome, and Atmospheric Convection. *Journal of Climate* 18(1):5-20.
- Yang, L., J. Chen, C. Huang, Y. Liu, S. Jia, L. Pan y D. Zhang. 2005. Validation of a cotton specific gene, *Sad1*, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic cottons. *Plant Cell Rep.* 2005, 24: 237-245.
- Zamudio, L., H. E. Hurlburt, E. J. Metzger y C. E. Tilburg. 2007. Tropical wave-induced oceanic eddies at Cabo Corrientes and the María Islands, Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans* (1978–2012) 112(C5).
- Zhang, A. B., K. Kubota, Y. Takami, J. L. Kim, J. K. Kim y T. Sota. 2005. Species status and phylogeography of two closely related *Coptolabrus* species (Coleoptera: Carabidae) in South Korea inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology* 14:3823–3841.

## IX. APÉNDICE

Apéndice 1. Listado, frecuencia y población de los 65 haplotipos de Cytb de *Elacatinus puncticulatus*

	Mule	Sono	Paz	Coli	Mich	Gue	Oax	C. Rica	Pana	Ecua
H1	3	8	7		1	1				20
H2	1	1								2
H3		1								1
H4	3									3
H5		1								1
H6		1								1
H7		1								1
H8		1								1
H9			2							2
H10				1	1					2
H11				1		2	4			7
H12				1						1
H13				1		1				2
H14				1						1
H15				1						1
H16					1	1	3			5
H17					1					1
H18						1				1
H19						1	1			2
H20						1				1
H21						1				1
H22						1				1
H23						1				1
H24						1				1
H25						1				1
H26						1				1
H27						1				1
H28						1				1
H29						1				1
H30						1				1
H31						1				1
H32						1				1
H33						1				1
H34						1				1
H35						1				1
H36						1				1



