



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Filogeografía comparada de organismos marinos con alto y bajo potencial de dispersión en el Caribe sur**

**Juan Carlos Narváez Barandica**

Universidad Nacional de Colombia  
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR  
Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR  
Santa Marta, D.T.C.H., Colombia  
2023



# **Filogeografía comparada de organismos marinos con alto y bajo potencial de dispersión en el Caribe sur**

**Juan Carlos Narváez Barandica**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ciencias – Biología**

Directores:

Ph.D., Arturo Acero Pizarro

Codirectora:

Ph.D., Lyda Castro García

Asesor:

PhD., Ricardo Betancur-R.

Línea de Investigación:

Biología Marina

Grupo de Investigación:

Sistemática y Biodiversidad Marina

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR

Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR

Santa Marta, D.T.C.H., Colombia

2023



*A mi acervo genético:*

**Ana Milena, María Victoria, Juan Miguel y  
Fátima María**

*A mis padres: **Rafael y Ofelia***

***A Dios**, quien ha guiado mis pasos y me ha  
sostenido en todo momento y en todo lugar*

*A la memoria de **Enrique Saade y Jacobo  
Blanco***

*Alguien me dijo otra vez que el papel tiene dos caras...*





## I. Agradecimientos

Estoy totalmente agradecido con mis directores y asesores de tesis por toda la colaboración que me dieron para llevar a feliz término este trabajo. Quiero expresarles mis agradecimientos a los doctores Arturo Acero Pizarro y Ricardo Betancur por haberme acogido a su grupo de investigación y sugerir las herramientas moleculares y los modelos biológicos que permitieron darle alcance a los objetivos de la tesis. También expreso mis agradecimientos a la Dra Lyda Castro García por haberme apoyado en la financiación de la tesis a través de los recursos de FONCIENCIAS de la Universidad del Magdalena que le otorgaron al grupo de investigación que dirige: Sistemática, Evolución y Ecología Molecular. También agradezco a MinCiencias por la financiación del trabajo de campo a través del proyecto “Filogeografía comparada de organismos marinos con amplia y limitada dispersión en el Caribe de Colombia: conociendo el pasado para conservar en el futuro” (Código 116174559171, COLCIENCIAS-Universidad Nacional de Colombia); a Corporation Center of Excellence in Marine Science (No. Contrato CO8JUNA – 2017) y a COLCIENCIAS-COLFUTURO por otórgame una beca para desarrollar el doctorado. A los directivos de la Universidad del Magdalena por haberme otorgado la comisión para estudios doctorales. Esta tesis también contó con recursos económicos de mi familia a través del fondo de inversiones Narvéez Saade. El trabajo de campo se realizó gracias al apoyo de Javier Torres y Alejandra Puentes, Santiago Estrada de Reef Shepherd; de Gilberto Orozco, Ana Infante, Ana Caruso, Germán Blanco, Eimmy González, William Castillo, Sindy Mendoza, Lilian Reza, Milton del Prado, Karina Tejeda, Leandra Petro, Manuel Urina, Eider Muñoz, Mayra Atencia y Juan Aguirre. En los aspectos técnicos de laboratorio se contó con los servicios y orientación de Australian Genomic Researcher Facility; y en los aspectos bioinformáticos conté con la ayuda de Julián Quintero de la Universidad Austral de Chile y Edison Lea del Centro de Genética y Biología Molecular de Universidad del Magdalena; y de Ricardo Betancur, Dahiana Arcila, Carmen Pedraza y Melissa Rincón de la Universidad de Oklahoma, a quienes también les agradezco por su hospitalidad durante mi estancia en Norman (OK). Agradecimiento especial a mis compañeras del doctorado: Diana Bustos, Gloria Ospina, Laura Perdomo, Edgar Arteaga y Milena Benavides; y a Ana Milena Cárdenas y Juan Pablo Rosas por el apoyo administrativo del proyecto y de los trámites de permisos ambientales. Finalmente, quiero agradecer a mis profesores del doctorado quienes contribuyeron significativamente en mi formación doctoral, especialmente a Arturo Acero, Sven Zea, Néstor Campos y Edna Márquez.



# Filogeografía comparada de organismos marinos con alto y bajo potencial de dispersión en el Caribe sur

## II. Resumen

Se evaluó la filogeografía comparada de especies marinas con amplia y limitada dispersión en el Caribe sur (sector Colombia) ante la presencia de barreras putativas: pluma del río Magdalena (PRM), estrechamiento de la plataforma continental debido al levantamiento de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) y efecto combinado de la ausencia del fondo y litoral rocoso somero entre el Cabo de la Vela y el sector de Santa Marta y el afloramiento semi permanente en La Guajira (AFR+APG). Se seleccionaron seis especies marinas, tres de fondos rocosos: *Acanthemblemaria rivasi* (con larva pelágica <22 días), *Cittarium pica* (con larva pelágica de ida corta <6 días) y *Nerita tessellata* (con larva pelágica >60 días). Tres especies de aguas someras de fondos blandos también fueron escogidos: *Melongena melongena* (sin larva pelágica), *Sciades proops* (sin larva pelágica y cuidado parental) y *Micropogonias furnieri* (larva pelágica >30 días). Se utilizó la técnica ddRad-seq para analizar SNPs de las seis especies. Se recolectaron muestras de cada especie desde La Guajira hasta el Golfo de Urabá y Capurganá para evaluar la importancia relativa de las barreras biogeográficas. Los análisis de diferenciación genética, de varianza molecular (AMOVA), PCA y los filogenéticos sugieren que cuatro especies se ajustan al modelo de cambio genético abrupto ante una barrera biogeográfica (*A. rivasi*, *C. pica*, *M. melongena* y *S. proops*). Así que por primera vez se suministra suficiente evidencia de un quiebre filogeográfico causado por PRM, principalmente para *A. rivasi* (AMOVA:  $\Phi_{CT}=0,420$ ,  $p<0,05$ ). Esto supone que PRM debe estar actuando como barrera biogeográfica para especies marinas que tienen limitación en su dispersión. El otro hallazgo fue el efecto combinado que causa la ausencia del fondo y litoral rocoso somero entre el Cabo de la Vela y el sector de Santa Marta y el afloramiento semi permanente en La Guajira (AFR+APG), la cual opera para *A. rivasi* ( $\Phi_{CT}=0,406$ ) y *C. pica* ( $\Phi_{CT}=0,224$ ). En lo que respecta a las especies de fondo blandos, se observó la influencia de SNSM y de factores ecológicos y oceanográficos sobre una ruptura genética entre Dibulla/Punta Gallinas e isla de Salamanca para *M. melongena* ( $\Phi_{CT}=0,317$ ) y *S. proops* ( $\Phi_{CT}=0,375$ ,  $p<0,05$ ). Un quiebre adicional se observó en *S. proops* ( $\Phi_{CT}=0,472$ ), causado por el sistema arrecifal ubicado en Bolívar. El análisis bayesiano permitió identificar tres poblaciones ( $K=3$ ) en la mayoría de las especies tanto las de fondos rocosos como las de fondos blandos, excepto para *N. tessellata* y *M. furnieri*, las cuales presentaron una sola población y se ajustan al

modelo de panmixia ( $K=1$ ). El análisis de congruencia filogeográfica se observó únicamente en la comparación *A. rivasi*-*C. pica*. El análisis multilocus de *C. pica* permitió determinar una alta congruencia genética y topológica entre los marcadores loci de SNP y las secuencias del gen COI, confirmando los efectos generalizados de la barrera AFR+APG en el genoma de la especie. Los 10 loci microsatélites y los SNPs fueron congruentes en la determinación de tres poblaciones. Bajos niveles de diversidad genética se observaron con los 10 loci microsatélites y la sobrepesca puede ser una de las causas de la pérdida de información genética en *C. pica*. Las secuencias del gen COI revelaron que *C. pica* presentó un proceso de expansión poblacional reciente y cambios históricos en el tamaño efectivo de la población. Un análisis exhaustivo de 15 especies marinas en el Caribe colombiano revela diversas historias de vida y estructuras genéticas. Las especies incluyen peces, moluscos, crustáceos, equinodermos y tiburones que habitan diversos sustratos. Las estrategias reproductivas van desde la fertilización externa hasta la interna, con comportamientos únicos como la incubación oral masculina. El análisis de la estructura genética utilizó microsatélites, ADN mitocondrial y SNP. Se observa una diferenciación genética moderada en los vertebrados, influenciada por el potencial de dispersión y la fecundidad. Un análisis de regresión de PLD con el  $K$  y  $\Phi/F_{ST}$  de las seis especies estudiadas y nueve registradas en la literatura determinó que el PLD puede predecir en un 70% el número de poblaciones probables y menos del 40% el nivel de subestructuración genética de las especies marino-costeras del Caribe sur. Se discuten aspectos biológicos, oceanográficos y ambientales para explicar el patrón filogeográfico de cada especie. Se discute la importancia de los resultados para el manejo y conservación de las especies estudiadas y se suministran recomendaciones para las autoridades ambientales y pesqueras.

**Palabras clave:** Barreras biogeográficas, sur del Mar Caribe, filogeografía comparada, fondos rocosos, fondos blandos someros.

# Comparative phylogeography of marine organisms with high and low dispersal potential in the Southern Caribbean

## III. Abstract

The comparative phylogeography of marine species with broad and limited dispersal in the southern Caribbean (Colombian sector) was evaluated in the presence of putative barriers: the Magdalena River plume (MRP), narrowing of the continental shelf due to the uplift of the Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), and the combined effect of the absence of shallow rocky substrates between Cabo de la Vela and the Santa Marta region and the semi-permanent upwelling in La Guajira (ARB+PUG). Six marine species were selected, three from rocky substrates: *Acanthemblemaria rivasi* (with pelagic larvae < 22 days), *Cittarium pica* (with short-distance pelagic larvae < 6 days), and *Nerita tessellata* (with pelagic larvae > 60 days). Three shallow-water species from soft bottoms were also chosen: *Melongena melongena* (without pelagic larvae), *Sciades proops* (without pelagic larvae and with parental care), and *Micropogonias furnieri* (pelagic larvae > 30 days). The ddRad-seq technique was used to analyze the SNPs of the six species. Samples of each species were collected from La Guajira to the Gulf of Urabá and Capurganá to assess the relative importance of biogeographic barriers. Genetic differentiation, molecular variance (AMOVA), PCA, and phylogenetic analyses suggest that four species fit the model of abrupt genetic change in the presence of a biogeographic barrier (*A. rivasi*, *C. pica*, *M. melongena*, and *S. proops*). Thus, for the first time, sufficient evidence is provided for a phylogeographic break caused by MRP, primarily for *A. rivasi* (AMOVA:  $\Phi_{CT} = 0.420$ ,  $p < 0.05$ ). The latter suggests that MRP is a biogeographic barrier for marine species with limited dispersal. The other finding was the combined effect of the absence of shallow rocky substrates between Cabo de la Vela and the Santa Marta region and the semi-permanent upwelling in La Guajira (ARB+PUG), which operates for *A. rivasi* ( $\Phi_{CT} = 0.406$ ) and *C. pica* ( $\Phi_{CT} = 0.224$ ). As for the soft-bottom species, the influence of SNSM and ecological and oceanographic factors on genetic break was observed between Dibulla/Punta Gallinas and Isla de Salamanca for *M. melongena* ( $\Phi_{CT} = 0.317$ ) and *S. proops* ( $\Phi_{CT} = 0.375$ ,  $p < 0.05$ ). An additional break was observed in *S. proops* ( $\Phi_{CT} = 0.472$ ), caused by the reef system in Barú Peninsula (Cartagena). The Bayesian analysis identified three populations ( $K = 3$ ) in most species,

both from rocky and soft substrates, except for *N. tessellata* and *M. furnieri*, which presented a single population and fit the panmixia model ( $K = 1$ ). Congruent phylogeographic analysis was observed only in the *A. rivasi*-*C. pica* comparison. The multilocus analysis of *C. pica* allowed determining high genetic and topological congruence between SNP loci markers and COI gene sequences, confirming the widespread effects of the ARB+PUG barrier in the species genome. The ten microsatellite loci and SNPs were congruent in determining three populations. Low levels of genetic diversity were observed with the ten microsatellite loci, and overfishing may be one of the causes of genetic information loss in *C. pica*. COI gene sequences revealed that *C. pica* underwent recent population expansion and historical changes in effective population size. A comprehensive analysis of 15 marine species in the Colombian Caribbean reveals diverse life histories and genetic structures. The species include fish, mollusks, crustaceans, echinoderms, and sharks inhabiting various substrates. Reproductive strategies include external to internal fertilization, with unique behaviors like male oral incubation. Genetic structure analysis used microsatellites, mitochondrial DNA, and SNPs. Moderate genetic differentiation is seen in vertebrates, influenced by dispersal potential and fecundity. A regression analysis of PLD with  $K$  and  $\Phi/F_{ST}$  of the six studied species and nine reported in the literature determined that PLD can predict 70% of the probable number of populations and less than 40% of the level of genetic substructuring in the marine-coastal species of the southern Caribbean. Biological, oceanographic, and environmental aspects to explain the phylogeographic pattern of each species are discussed. The importance of the results for the management and conservation of the studied species is discussed, and recommendations are provided for environmental and fisheries authorities.

**Keywords:** Caribbean Sea, comparative phylogeography, biogeographic barrier, rocky shore, shallow soft-bottom.

## IV. Tabla de contenido

	Pág.
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Generalidades .....</b>	<b>7</b>
1.1 Filogeografía.....	7
1.2 Barreras biogeográficas .....	10
1.2.1 Sur del Caribe como modelo de estudio de filogeografía comparada .....	11
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>17</b>
2.1 Recolecta de las muestras .....	17
2.2 Trabajo en laboratorio .....	19
2.3 Ensamblaje de las secuencias .....	19
<b>3. Filogeografía comparada de especies marinas que contrastan en historias de vida larval ante barreras putativas del Caribe Sur .....</b>	<b>23</b>
3.1 Resumen .....	23
3.2 Introducción .....	24
3.3 Materiales y métodos .....	27
3.3.1 Análisis de datos.....	27
3.3.1.1 Estructura genética y filogeográfica .....	28
3.3.1.2 Modelo genético poblacional.....	29
3.3.1.3 Concordancia filogeográfica entre especies.....	29
3.4 Resultados.....	30
3.4.1 Estructura filogeográfica .....	31
3.4.2 Identificación de quiebres filogeográficos .....	39
3.4.3 Modelo poblacional genético .....	44
3.4.4 Concordancia filogeográfica entre especies .....	48
3.5 Discusión .....	51
3.5.1 Estructura filogeográfica .....	52
3.5.1.1 Especies de alto potencial de dispersión .....	52
3.5.1.2 Especies de bajo potencial de dispersión .....	53
3.5.1.3 Identificación de los quiebres filogeográficos.....	55
3.5.2 Modelo poblacional de especies que contrastan en el potencial larval .....	59
3.5.3 Concordancia filogeográfica entre especies .....	60
<b>4. Congruence between microsatellite loci, SNPs, and COI gen reveals a phylogeographic break in the southern Caribbean Sea: the case of West Indian top shell <i>Cittarium pica</i> (Gastropoda: Tegulidae) .....</b>	<b>63</b>
4.1 Abstract .....	63
4.2 Introduction.....	64
4.3 Materials and methods .....	67

4.3.1	Samples collected.....	67
4.3.2	Laboratory procedures for microsatellite loci, mitochondrial COI gen and SNPs loci	68
4.3.3	Analysis of data .....	70
4.3.3.1	Genetic and phylogeographic structure.....	70
4.3.3.2	Phylogenetic analysis.....	71
4.3.3.1	Congruence between molecular markers.....	72
4.3.3.2	Demographic history .....	73
4.4	Results .....	73
4.4.1	Genetic and phylogeographic structure .....	73
4.4.2	Phylogeographic break .....	78
4.4.1	Congruence between molecular markers .....	78
4.4.2	Demographic history.....	82
4.1	Discussion .....	85
4.1.1	Genetic and phylogeographic structure .....	85
4.1.2	Demographic history.....	88
4.1.3	Considerations for the conservation of <i>C. pica</i> .....	89
4.1.4	Conclusions .....	90
<b>5.</b>	<b>Exploring genetic patterns and life history traits of marine species in the Colombian Caribbean: insights and limitations .....</b>	<b>93</b>
5.1	Abstract .....	93
5.2	Introduction.....	94
5.3	Materials and Methods .....	96
5.3.1	Data source .....	96
5.3.2	Data analysis .....	96
5.4	Results .....	105
5.4.1	Generalities of the life history traits and genetic structure of the species.....	105
5.4.2	Relationships between PLD and genetic structure .....	108
5.5	Discusion.....	112
5.5.1	Generalities of the life history and genetic structure of the 15 species.....	112
5.5.2	Relationships between PLD and genetic structure: insights and limitations for the Colombian Caribbean.....	114
5.5.3	Recommendations for conservation .....	116
5.5.4	Conclusions .....	117
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>119</b>
6.1	Conclusiones.....	119
6.2	Recomendaciones.....	121
<b>7.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>125</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>143</b>

## V. Lista de figuras

<b>Figura 1-1.</b> Esquema de las metodologías de genotipado RAD-seq (a) y ddRAD-seq (b). Tomado de López de Heredia (2016). .....	10
<b>Figura 1-2.</b> Cambios de la plataforma continental del suroeste del Caribe antes (a) y después (b) del desplazamiento de la Sierra Nevada de Santa Marta (tomado de Betancur et al., 2010). .....	12
<b>Figura 1-3.</b> Principales corrientes del sur del Mar Caribe. Tomado del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas (Pronóstico Climático del Caribe Colombiano No. 83, <a href="http://www.cioh.org.co">www.cioh.org.co</a> ). Esquemas de las corrientes son basados en Andrade (2001). .....	13
<b>Figura 2-1.</b> Mapa del área de estudio. Los rombos indican las áreas de muestreo (los números con literal a y de color naranja: fondos rocosos; los números con literal b y de color verde: fondos blandos) y los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). En la tabla 2-1 se describen los nombres de cada sitio. ....	17
<b>Figura 2-2.</b> Gráficas de las diferentes combinaciones de los parámetros de ensamblaje para <i>C. pica</i> (A), <i>A. rivasi</i> (B), <i>N. tessellata</i> (C), <i>M. melongena</i> (D), <i>S. proops</i> (E) y <i>M. furnieri</i> (F). El punto azul es la combinación seleccionada para ensamblar las secuencias de cada especie. ....	22
<b>Figura 3-1.</b> Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para <i>Acanthemblemaria rivasi</i> en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados ( <b>Tabla 3-5</b> ). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). ....	32
<b>Figura 3-2.</b> Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de	

componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Cittarium pica* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (**Tabla 3-5**). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). ..... 33

**Figura 3-3.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Nerita tessellata* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (**Tabla 3-5**). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). ..... 34

**Figura 3-4.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Melongena melongena* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (**Tabla 3-5**). los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). ..... 36

**Figura 3-5.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Sciades proops* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (**Tabla 3-5**). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). ..... 37

**Figura 3-6.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Micropogonias furnieri* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (**Tabla 3-5**). Los triángulos y línea roja señalan



las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú)..... 38

**Figura 3-7.** Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud con la matriz de SNPs y la representación de los resultados del análisis de STRUCTURE indicando el número de K más probable y relacionando localidades del Caribe de Colombia para *A. rivasi* (A), *C. pica* (B) y *N. tessellata* (C). Las líneas punteadas indican las barreras putativas..... 42

**Figura 3-8.** Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud con la matriz de SNPs y la representación de los resultados del análisis de STRUCTURE indicando el número de K más probable y relacionando localidades del Caribe de Colombia para *M. melongena* (A), *S. proops* (B) y *M. furnieri*. Las líneas punteadas indican las barreras putativas. .... 43

**Figura 3-9.** Gráficos de la prueba de Mantel entre las distancias geográficas transformadas a logaritmo (lineales y de borde costero) y las distancias genéticas linealizadas [ $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ] (izquierda); gráfico de correlograma de los coeficientes de correlación y los promedios de  $\Phi_{ST}$  estimados en cada marca de clase de distancia geográfica lineal (derecha). *A. rivasi* (A), *C. pica* (B) y *N. tessellata* (C).  $r_m$ =coeficiente de correlación de la prueba de Mantel; p de significancia corregido después de 9999 permutaciones. .... 45

**Figura 3-10.** Gráficos de la prueba de Mantel entre las distancias geográficas transformadas a logaritmo (lineales y de borde costero) y las distancias genéticas linealizadas [ $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ] (izquierda); Grafico de correlograma de los coeficientes de correlación parciales y los promedios de  $\Phi_{ST}$  estimados en cada marca de clase de distancia geográfica del borde (derecha). *M. melongena* (A), *S. proops* (B) y *M. furnieri* (C).  $r_m$ =coeficiente de correlación de la prueba de Mantel; p de significancia corregido después de 9999 permutaciones..... 46

**Figura 3-11.** Dendrogramas de los valores de  $\Phi_{ST}$  construidos con el método UPGMA para *A. rivasi*, *C. pica* y *N. tessellata*, y análisis de autocorrelación espacial entre las matrices de  $\Phi_{ST}$  transformadas a logaritmo, relacionando las localidades en el ámbito geográfico del Caribe sur, sector Colombia. A. análisis entre *A. rivasi* y *C. pica*; B. entre *A. rivasi* y *N. tessellata*; C. entre *C. pica* y *N. tessellata*. FC= factor de concordancia topológica; W=estadístico de Kendall de la congruencia topológica;  $r_m$ =coeficiente de correlación de Mantel; p=nivel de significancia. Los colores de los nombres de los sitios: negro, azul y rojo indican alta, media y baja concordancia en sus ubicaciones en los dendrogramas..... 49

**Figura 3-12.** Dendrogramas de los valores de  $\Phi_{ST}$  construidos con el método UPGMA para *M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri*, y análisis de autocorrelación espacial entre las matrices de  $\Phi_{ST}$  transformadas a logaritmo, relacionando las localidades en el ámbito geográfico del Caribe sur, sector Colombia. A. análisis entre *S. proops* y *M. melongena*; B. entre *M. melongena* y *M. furnieri*; C. entre *S. proops* y *M. furnieri*. FC= factor de concordancia topológica; W=estadístico de Kendall de la congruencia topológica;

$r_m$ =coeficiente de correlación de Mantel; $p$ =nivel de significancia. Los colores de los nombres de los sitios: <b>negro</b> , azul y rojo indican alta, media y baja concordancia en sus ubicaciones en los dendrogramas. ....	50
<b>Figura 3-13.</b> Análisis de clúster utilizando el método de agrupamiento de Ward a partir de los atributos genéticos y biológicos de las especies asociadas a fondos rocosos y blandos someros del Caribe Sur, sector de Colombia. ....	61
<b>Figura 4-1.</b> Map of the study area, indicating the five sampling localities. CV: Cabo de la Vela. SM: Santa Marta. CT: Cartagena. IF: Isla Fuerte. CP: Capurganá. The sea surface temperature map during January 2020, which was taken and modified from CIOH (Pronóstico Climático del Caribe Colombiano No. 83. <a href="http://www.cioh.org.co">www.cioh.org.co</a> ). Scheme of currents based on Andrade (2001) and Correa-Ramirez et al. (2020). The two putative barriers are indicated: the Magdalena River plume (MRP) and the combination of the absence of a rocky bottom and the almost permanent upwelling in The Guajira peninsula (ARB+PUG). ....	68
<b>Figura 4-2.</b> Bar graphs of the population ancestry coefficient from Structure's analysis indicating the distribution of the number of K probable populations (A: microsatellite loci; C: SNP loci); Discriminant analysis of principal components (B: microsatellite loci; D: SNP loci) among the samples from the five localities analyzed for <i>Cittarium pica</i> in the Southern Caribbean, Colombia sector. Map of the study area, indicating the five sampling localities. CV: Cabo de la Vela, SM: Santa Marta, CT: Cartagena, IF: Isla Fuerte, CP: Capurganá. Gray arrow: Caribbean Current; black arrow: Caribbean Counter Current. Scheme of currents based on Andrade (2015) and Correa-Ramírez et al. (2020). The red line indicates the putative barrier: the combination of the absence of shallow rocky bottoms and the almost permanent upwelling in La Guajira (ARB+PUG). (E) phylogenetic tree network constructed with the SNP data set (top) and COI gene haplotype network (bottom), among the samples from the five localities analyzed for <i>Cittarium pica</i> in the Southern Caribbean, Colombia sector. The red line on the map indicates the putative barrier. ....	77
<b>Figura 4-3.</b> Dendrogram constructed with the genetic distance of Nei (1978) from the ten species-specific microsatellite loci and using the UPGM clustering method (A); ML phylogenetic trees constructed with the mtDNA COI gene (B) and the SNP dataset (C) for <i>C. pica</i> in the Southern Caribbean, Colombia sector. The red line indicates the barrier: the combination of the absence of a rocky bottom and the almost permanent upwelling in The Guajira peninsula (ARB+PUG). The tips with colors indicate blue for Cabo de la Vela, green for Santa Marta, red for Cartagena, orange for Isla Fuerte, and yellow for Capurganá. ....	80
<b>Figura 4-4.</b> Analysis of genetic and topological congruence between Microsatellite loci, SNP loci and COI gene markers was performed using the CADM test (Campbell et al., 2011), and the concordance factor (CF) and Euclidean distance (DE) were determined using the algorithms of Kendall et al. (2018). Dendrograms were constructed with the $\Phi_{ST}$ values using the UPGMA clustering method and relating the localities sampled for <i>C. pica</i> in the Southern Caribbean, Colombia sector. $W$ = Kendall statistic; $r_m$ = Mantel correlation coefficient; $p$ = significance value. ....	81

**Figura 4-5.** Plots of the paired difference distribution model for the sequences of a 440 bp segment of the COI gene for *Cittarium pica* in the Southern Caribbean, Colombia sector, provided by the Mismatch distributions analysis. A. Clade 1: Cabo de la Vela; B. Clade 2: Santa Marta+Cartagena+Capurganá; C. whole dataset.  $n$  is the number of sequences;  $\theta_0$  and  $\theta_1$  are population size before and after expansion, respectively;  $r$  is the Raggedness statistic. .... 83

**Figura 4-6.** *Cittarium pica* demographic history from the Southern Caribbean, Colombia sector, estimated by Bayesian Skyline Plots (BSP) for (A) clade 1: Cabo de la Vela, (B) clade 2: Santa Marta+Cartagena+Capurganá, and (C) the entire COI gene dataset. The dark black solid line represents the median effective population size estimates over time, and the light blue line indicates the upper and lower 95% confidence limits. The effective population size ( $N_e$ ) is estimated as the log effective population size multiplied by generation time. The graphs below depict the simulated projection of historical sea level change over the last 430 thousand years (Spratt and Lisiecki, 2016). The vertical bands indicate the range of the last glacial period..... 84

**Figura 5-1.** Box and whisker plot of fixation index values across categories of level of genetic differentiation (a), organism type (b), habitats (c), fecundity (d), molecular markers (e), and dispersal potential (f) from fifteen marine species studied within the geographical scope of the Colombian Caribbean.  $n$  indicates number of species. .... 107

**Figura 5-2.** Relationship between global genetic structure determined by the fixation index ( $F_{ST}/\Phi_{ST}$ ) and the average duration of pelagic larval stage (PLD) for fifteen marine species, including (a) and excluding (b) species lacking a pelagic larval stage, associated with shallow bottoms and pelagic environments in the Colombian Caribbean. Analyses were conducted considering the seven species studied using SNPs (c) and the other seven using microsatellite loci (d). .... 109

**Figura 5-3.** Relationship between the number of populations ( $K$ ) and the average duration of pelagic larval stage (PLD) for fifteen marine species, including (a) and excluding (b) species lacking a pelagic larval stage, associated with shallow bottoms and pelagic environments in the Colombian Caribbean. Analyses were conducted considering the seven species studied using SNPs (c) and the other seven using microsatellite loci (d). .... 110

## VI. Lista de tablas

<b>Tabla 1-1.</b> Especies modelo del estudio, describiendo el nombre del hábitat, grupo taxonómico, tipo de fecundación, tipo de cuidado de las crías e historia de vida larval...	15
<b>Tabla 2-1.</b> Sitios de muestreos, coordenadas y número de muestras para cada una de las especies estudiadas en los tipos de ecosistemas someros del Caribe de Colombia.	18
<b>Tabla 3-2.</b> Valores pareados de $\Phi_{ST}$ entre las cinco localidades muestreadas en el Caribe de Colombia para las especies <i>A. rivasi</i> , <i>C. pica</i> , <i>N. tessellata</i> . Todos los valores presentaron nivel de significancia $p < 0,005$ , excepto los indicados con asterisco.....	34
<b>Tabla 3-3.</b> Valores pareados de $\Phi_{ST}$ entre localidades muestreadas en el Caribe de Colombia para las especies <i>M. melongena</i> , <i>S. proops</i> y <i>M. furnieri</i> . Todos los valores presentaron nivel de significancia $p < 0,005$ , excepto los indicados con asterisco.....	38
<b>Tabla 3-4.</b> Análisis de varianza molecular (AMOVA) evaluando los efectos de las tres barreras putativas sobre las especies <i>Acanthemblemaria rivasi</i> , <i>Cittarium pica</i> , <i>Nerita tessellata</i> , <i>Melongena melongena</i> , <i>Sciades proops</i> y <i>Micropogonias furnieri</i> . Los valores del estadístico evaluaron el nivel de diferenciación entre los grupos ( $\phi_{CT}$ ), dentro de las localidades de cada grupo ( $\phi_{SC}$ ) y entre todas las localidades ( $\phi_{ST}$ ); se indica el porcentaje de variación de cada fuente de comparación; * nivel de significancia $p > 0,05$ . .....	41
<b>Tabla 3-5.</b> Resultados de las pruebas de Mantel con las distancias geográficas (lineales y de borde costero) y genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) y con las distancias geográficas transformadas a logaritmo correlacionadas con la distancia genética linealizada [ $\Phi_{ST}/(1 - \Phi_{ST})$ ]; resultados del correlograma de Mantel y decisión del tipo de modelo poblacional. $r_m$ =coeficiente de correlación de la prueba de Mantel; $D_g$ =distancia geográfica; $\Phi_{ST}$ =índice de fijación; IBD= aislamiento por distancia; $P$ de significancia corregido después de 9999 permutaciones. ....	47
<b>Tabla 3-6.</b> Resumen de los análisis para determinar estructura filogeográfica de <i>A. rivasi</i> , <i>C. pica</i> , <i>N. tessellata</i> , <i>M. melongena</i> , <i>S. proops</i> y <i>M. furnieri</i> en el Caribe sur. ....	48
<b>Tabla 3-7.</b> Análisis de factor de concordancia, y congruencia topológica y genética entre pares de especies codistribuidas en los ecosistemas de fondos rocosos someros y fondos blandos someros del Caribe sur, sector Colombia. $W$ =estadístico de Kendall; $r_m$ =coeficiente de correlación de Mantel; $p$ =nivel de significancia. ....	51
<b>Tabla 4-1.</b> Number of samples per locality and type of molecular marker for <i>Cittarium pica</i> from the Southern Caribbean, Colombia sector. Years of sampling: a. 2013; b. 2017.....	67
<b>Tabla 4-2.</b> Values of genetic diversity indices by molecular marker in the five localities sampled in the southern Caribbean, Colombia sector for <i>Cittarium pica</i> .....	75

**Tabla 4-3.** Pairwise comparison of  $\Phi_{ST}$  between the five localities sampled across the southern Caribbean (Colombia sector) for *Cittarium pica* from the southern Caribbean, Colombia sector. Below and above the diagonal, the  $F_{ST}$  and  $\Phi_{ST}$  values are provided, respectively. All values presented significance level of  $p < 0.005$ , except those indicated with an asterisk. .... 76

**Tabla 4-4.** Hierarchical AMOVA evaluating the effect of two putative barriers for *Cittarium pica* from the five localities sampled in the Southern Caribbean. Colombia sector. Statistic values assessed the level of differentiation between groups ( $\Phi_{CT}$ ). within localities within each group ( $\Phi_{SC}$ ) and between all localities ( $\Phi_{ST}$ ); the percentage of variation for each source of comparison is indicated; \* significance level  $p > 0.05$ . K is the most likely population quantity based on Bayesian analysis. \*\*  $F_{ST}$  value of microsatellite loci was calculated by excluding null alleles (Chapuis and Estoup. 2007). .... 79

**Tabla 4-5.** Demographic history indices for *Cittarium pica* from the Southern Caribbean, Colombia sector. SSD= sum of squares deviations;  $R_2$ =Ramos-Onsins and Rozas test;  $rg$ = mismatch distribution Raggedness index. Values in bold indicate  $p$ -value  $< 0.05$ . \* Significance level  $p > 0.05$ . .... 82

**Tabla 5-1.** Marine Species Studied Across the Geographical Scope of the Colombian Caribbean (From The Guajira peninsula to Capurganá). Minimum, maximum, and average values of pelagic larval duration (PLD) are provided for the species, ecological, biological, and genetic characteristics (including fixation index and number of populations), and the main findings from their genetic studies. .... 98

**Tabla 5-2.** Results of linear regression analyses between PLD values, fixation index ( $F_{ST}/\Phi_{ST}$ ) values, and number of populations (K) for marine species studied in the Colombian Caribbean. Results include all species analyzed with three molecular markers and those studied using SNP and microsatellite loci. The procedure was also conducted, excluding species lacking a pelagic larval stage. The asterisk denotes regressions with a significance level (P value) of  $< 0.05$ . n indicates number of species..... 109

## VII. Lista de anexos

<b>Anexo 1.</b> Resultado del análisis de neutralidad de los SNPs para cada una de las especies. A. <i>A. rivasi</i> , B. <i>C. pica</i> , C. <i>N. tessellata</i> , D. <i>M. melongena</i> , E. <i>S. proops</i> y F. <i>M. furnieri</i> . G. También se presentan los resultados de los análisis con los loci de microsatélites evaluados en <i>C. pica</i> . .....	144
<b>Anexo 2.</b> Resumen de los parámetros de variabilidad genética para <i>A. rivasi</i> , <i>C. pica</i> , <i>N. tessellata</i> , <i>M. melongena</i> , <i>S. proops</i> y <i>M. furnieri</i> distribuidos entre las localidades muestreadas en el Caribe de Colombia. Valores promedios de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ); diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y endogamia ( $F_{is}$ ). .....	147
<b>Anexo 3.</b> Descripción de los iniciadores y condiciones de la PCR para el proceso de amplificación del gen COI del ADNmt para <i>C. pica</i> . .....	149
<b>Anexo 4.</b> Sample Size, No. Alleles, Private alleles, Observed Heterozygosity, Expected, Fixation Index, and deviation of the Hardy-Wienberg equilibrium (E-HW) for 10 microsatellite loci in each locality sampled from <i>C. pica</i> . .....	151
<b>Anexo 5.</b> Estimating $F_{st}$ of Weir (1996) for each pair of localities both using the excluding null alleles correction described in Chapuis and Estoup (2007), for <i>Cittarium pica</i> from the southern Caribbean, Colombia sector. .....	154
<b>Anexo 6.</b> Estimating null allele frequency using the EM algorithm (Dempster et al. 1977) for 10 microsatellite loci of the <i>C. pia</i> . 1. Cabo de la Vela, 2. Santa Marta, 3. Cartagena, 4. Isla Fuerte y 5. Capurganá. .....	155

# Introducción

La filogeografía estudia los principios y procesos que dominan los arreglos espaciales de los linajes genéticos, especialmente dentro y entre especies (*sensu* Avise, 2000). La filogeografía considera que la gran mayoría de las especies presentan cierto grado de estructura genética asociada con la geografía (Domínguez y Vásquez, 2009). Sin embargo, la estructura filogeográfica de una especie es producto de la interacción histórica entre los procesos demográficos y genealógicos y la dinámica de los procesos de la tierra (geológicos, oceanográficos o climáticos). Por este motivo, puede evaluar escenarios históricos alternativos (vicarianza o dispersión) que dan cuenta de los patrones espaciales actuales de las especies o poblaciones (Avise, 2000; Cresci et al., 2003). Estos escenarios van a depender de la capacidad de dispersión de las especies para sobreponerse a las barreras que se originaron a partir de factores geológicos, ecológicos-oceanográficos, incluso climáticos. Se espera que estos factores tengan efectos generalizados en la comunidad de organismos cuando algunas especies exhiban similares patrones filogeográficos. Por este motivo, surgió la filogeografía comparada que permite probar la hipótesis de si diferentes taxones codistribuidos en una región y que han evolucionado independientemente están influidos por los mismos factores ecológicos y evolutivos que afectan de manera simultánea su estructura genética y la distribución actual de sus poblaciones (Avise, 2000, 2009; Hickerson et al., 2010).

Al considerarse el océano un ambiente continuo y un sistema abierto, puede suponerse que las especies marinas presentan conectividad genética a lo largo de su distribución. Son las corrientes las que influyen en el flujo genético entre sus poblaciones (Hellberg et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de estudios han demostrado que las especies marinas presentan un nivel de subdivisión genética poblacional como respuestas a factores históricos, geológicos o ecológicos-oceanográficos, pero de manera segregativa en taxones que contrastan en historias de vida (Cowen, 2002; Hellberg et al., 2002; Crandall et al., 2008; Avise, 2009; Ayre et al., 2009; Pelc et al., 2009; Derycke et al., 2013; Crandall et al., 2014; Femberg et al., 2014; Villamor et al., 2014; Mattos et al., 2019). Una combinación de esos factores y rasgos biológicos (aspectos de la biología reproductiva) y ecológicos (aspectos del hábitat) de las especies permite entender la estructura filogeográfica y genética de los organismos marinos (Cowen, 2002; Rocha, 2003; Ayre et al., 2009; Pelc et al., 2009; Femberg et al., 2014; Haye et al., 2014; Dalongeville et al., 2016; Fratini et al., 2016; Krueck et al., 2020). Por ejemplo, el potencial de dispersión de las especies marinas se considera como uno de los atributos biológicos que están correlacionados con la estructura filogeográfica y genética (Cowen, 2002; Cowen et al., 2006; Pelc et al., 2009). Ese potencial se interpreta como el tiempo

que dura el estado larval pelágico (pelagic larval duration, PLD). Varios estudios documentan que especies con menos días de vida larval pelágica, incluso aquellas sin un periodo pelágico (Arndt y Smith, 1998; Kelly y Palumbi, 2010), tienden a presentar quiebres filogeográficos o subestructuración genética poblacional ante la existencia de barreras contemporáneas o históricas (Pelc et al., 2009; Haye et al., 2014; Villamor et al., 2014), en comparación con aquellas de mayor número de días, las cuales presentan bajo nivel de subestructuración o panmixia (Arndt y Smith, 1998; Haye et al., 2014; Kelly y Palumbi, 2010; Teske et al., 2017; Mattos et al., 2019; Loera-Padilla et al., 2021; Stark et al., 2021). Esto puede colocarse como premisa que el PLD puede ser un buen predictor de la estructura genética de las poblaciones marinas. Sin embargo, varios estudios cuestionan (Weersing y Toonen, 2009; Luiz et al., 2012) o aceptan esta premisa y motivan plantear procesos investigativos para confirmar alguna de las dos posiciones (Cowen et al., 2006; Ayre et al., 2009; Kelly y Palumbi, 2010; Haye et al., 2014), idealmente en otros escenarios marinos distintos en donde se han desarrollado.

En los casos de especies que exhiben quiebres filogeográficos, son las barreras blandas o permeables a las que se les atribuyen las causas de esa condición. Estas barreras implican procesos hidrológicos como las corrientes marinas, gradientes de las propiedades fisicoquímicas del agua del mar en el sector costero producto de las descargas continentales de los ríos; o las grandes distancias que limitan la dispersión de los organismos adultos o en la fase larval (Ayre et al., 2009; Luiz et al., 2012; Silva et al., 2018). Por ejemplo, varias regiones marinas en el mundo han sido escenarios para conocer la filogeografía de corales, crustáceos, moluscos, anélidos y peces. La mayoría se han concentrado en la región de Baja California, el triángulo de Coral del Pacífico, Sur de Australia y Suramérica. En estos estudios surgen las corrientes, la ausencia del hábitat específico y la geomorfología de la línea costera como los principales factores que causan el patrón filogeográfico de las especies (Pelc et al., 2009; Derycke et al., 2013; Femberg et al., 2014; Mattos et al., 2019).

Uno de los escenarios pocos estudiados es el Caribe Sur en el sector marino de Colombia, el cual se caracterizó por presentar diferentes sucesos históricos de cambios en la geomorfología de la línea costera debido a la variación del nivel del mar durante el último periodo de glaciación y al levantamiento y movimiento de los sistemas montañosos de la cuenca Caribe, como la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM). Esto cambió en más de una ocasión la plataforma continental, la dirección de las corrientes marinas y la ubicación de la desembocadura del río Magdalena (Flórez, 2003) que pudo afectar de manera general la estructura filogeográfica de la comunidad de organismos marino-costeros. Consecuente con eso hay estudios con datos empíricos sobre filogeografía (Taylor y Hellberg, 2003; Baums et al., 2005, 2006; Díaz-Ferguson et al., 2010; Foster et al., 2012; Porto-Hannes et al., 2014; Devlin y Baums, 2017; Loera-Padilla et al., 2021) y de modelos de dispersión larval (Cowen et al., 2006) que sugieren la existencia de una ruptura en la conectividad genética de las poblaciones a ambos lados del Caribe (continental y antillano), que la ubican entre Venezuela y Colombia (Baums et al., 2005; Cowen et al., 2006; Devlin y Baums, 2017). También puede deberse a fenómenos oceanográficos, como la pluma del río Magdalena (RM) (Foster et al., 2012); sin



embargo, no han sido lo suficientemente concluyentes para corroborarlo. Esto se debe a que los estudios son monoespecíficos y no han tomado en cuenta localidades de Colombia (Baums et al., 2005; Díaz-Ferguson et al., 2010; Porto-Hannes et al., 2014; Devlin y Baums, 2017; Rippe et al., 2017). Los trabajos que incluyeron estaciones colombianas sólo han muestreado cercanamente a un costado del río (Foster et al., 2012; Alegría-Ortega et al., 2020) o en otros, ambos costados, pero sólo tomando en cuenta especies con larva pelágica de más de 12 días de duración y concluyendo que el RM es una barrera permeable al flujo genético (especies de corales, camarón, moluscos, erizo y peces: Baums et al., 2005; Ospina-Guerrero et al., 2008; Landínez et al., 2009; Díaz-Ferguson et al., 2010; Foster et al., 2012; Caiafa et al., 2018; Mendoza et al., 2019; Benavides, 2020; Atencia et al., 2021; Loera-Padilla et al., 2021; Puentes, 2021; Velasco-Montoya et al., 2022).

A pesar de lo anterior, su pluma entrega anualmente  $142 \times 10^6$  toneladas de sedimentos al Mar Caribe. El frente de descarga del río se extiende 6.5 km hacia el mar y se caracteriza por una alta turbidez ( $178.6 \pm 78.7 \text{ mg L}^{-1}$ ), comparable a estimaciones de los ríos Amazonas y Yangtsé. Además, el frente de descarga de RM diluye la salinidad desde 36 en el océano abierto hasta  $28.4 \pm 0.4$  a 6.5 km de la costa, y hasta  $10.8 \pm 3.4$  en la desembocadura del río (Torregroza-Espinosa et al., 2020, 2021). Estas condiciones fisicoquímicas y su influencia en el Mar Caribe sugieren que la pluma de RM debe actuar como una barrera biogeográfica (barrera putativa 1) para especies marinas que tienen limitaciones en su dispersión, especialmente aquellas cuyas larvas pelágicas no pueden sobrevivir al intentar cruzar esta área. Quizás no pueden tolerar la disminución en la salinidad y las temperaturas más altas ( $\geq 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en las aguas marinas de la desembocadura, así como la alta turbidez, que son posibles factores que regulan el éxito de la dispersión biológica.

Por otro lado, se propuso otra barrera de origen terrestre que también influye en los patrones filogeográficos marinos de la región (barrera putativa 2). Se trata de las estribaciones de la SNSM hacia el mar Caribe que causa una ruptura en la plataforma continental en el norte de Colombia (Rangel e Idárraga, 2010) y que hasta ahora se ha detectado que afecta a una especie de hábito demersal en aguas someras que carece de larva pelágica (Betancur et al., 2010). Esta ruptura ocurre en el sector de Santa Marta-Parque Nacional Natural Tayrona.

Una tercera barrera se encuentra ubicada entre los  $74^\circ$  y  $71^\circ$  Oeste, incluyendo Santa Marta y la Península de La Guajira, la cual es atribuida al proceso de afloramiento que ocurre en este sector (barrera putativa 3). El afloramiento de la Península de La Guajira provoca una disminución de la temperatura del agua (menos de  $25^\circ\text{C}$ ) hacia la región de Santa Marta; y debido a las descargas de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato la temperatura aumenta desde el oeste de Santa Marta hasta el suroeste del Caribe colombiano (más de  $29^\circ\text{C}$ ), incidiendo también en la salinidad, con un gradiente opuesto en los valores de temperatura (Bernal et al., 2006; Lozano et al., 2010). Para entender el proceso de afloramiento, se debe reconocer la influencia de las dos corrientes oceánicas principales que operan en el Caribe colombiano: la Corriente del Caribe (CC) y la

Contracorriente del Caribe (también conocida como Contracorriente Panamá-Colombia; CCC). La CC se origina en la Corriente del Norte de Brasil y fluye de este a oeste, llevando aguas cálidas superficiales al Golfo de Venezuela y al Mar Caribe Central. Esta corriente tiene su influencia en la Península colombiana de La Guajira. Por otro lado, la CCC se origina en el Giro Panamá-Colombia y desempeña un papel significativo en el transporte de agua hasta el área de Cabo de la Vela durante el debilitamiento de los vientos alisios del norte (Andrade, 2015; Bernal et al., 2006; Orfila et al., 2021). Cuando la CC y la CCC convergen cerca de la Península de La Guajira, junto con la acción de los vientos mar afuera y el efecto Coriolis, se produce un movimiento ascendente de aguas más profundas y ricas en nutrientes hacia la superficie. Las aguas superficiales son empujadas hacia mar adentro por los vientos que soplan paralelos a la costa, permitiendo que las aguas más frías y ricas en nutrientes se eleven desde las profundidades. La Península de La Guajira experimenta un fuerte afloramiento desde diciembre hasta mayo debido a los vientos alisios de alta intensidad, con efectos más débiles de junio a agosto, concentrados principalmente en el extremo norte de la Península, específicamente en Cabo de la Vela ( $\sim 72^\circ$  Oeste, Figura 1a; ver revisión en Gaspar y Acero, 2020). Por esta razón, el afloramiento es categorizado como semi permanente. Otro evento de afloramiento ocurre entre Santa Marta y el Parque Nacional Natural Tayrona (PNN Tayrona), que es estacional y típicamente ocurre durante el pico de los vientos alisios del norte de diciembre a marzo. En ambos casos, el agua aflorada es transportada hacia el mar por corrientes superficiales y se agrega al agua llevada por la CC hacia el Caribe Central (Andrade Amaya, 2015; Correa-Ramírez et al., 2020; Gaspar & Acero, 2020), causando posiblemente un efecto disruptivo en la conectividad genética de especies marinas asociadas con arrecifes rocosos poco profundos. Esta barrera fue propuesta en el pasado con datos de simulación (Cowen et al., 2006). Sin embargo, estudios experimentales han rechazado esta hipótesis, ya que las especies asociadas con fondos rocosos y arrecifes de coral que se evaluaron tienen un alto potencial de dispersión (Benavides, 2020; Quintero-Galvis et al., en prensa) o no incluyeron muestras de la Península de La Guajira (Velasco-Montoya et al., 2022; García-Urueña et al., 2022; Ballesteros-Contreras et al., 2022).

Finalmente, varios estudios con algunos modelos biológicos insinúan que especies asociadas al litoral rocoso y a sistemas lagunares costeros en el Caribe de Colombia, son regulados en su conectividad por las corrientes marinas que se desprenden desde la península de La Guajira hacia Caribe Central, CC y CCC, constituyéndose en otros posibles factores físicos que pueden estar regulando el patrón filogeográfico de especies marinas en este sector del Caribe (Landínez et al., 2009; Mendoza et al., 2019; Atencia et al., 2021; Aguirre-Pabón et al., 2022; García-Umaña et al., 2022; Quintero-Galvis en prensa).

A pesar de todo lo anterior, la estructura física actual del suroeste del Caribe permite suponer que las poblaciones de organismos marinos asociados a la plataforma continental que fueron susceptibles a los cambios ocurridos en la línea costera conservan en el genoma esos registros históricos y no han sido revelados porque los estudios no han sido enfocados directamente para probarlo. Esos registros pueden ser revelados

bajo los métodos analíticos de la filogeografía (Avice, 2000; Emerson et al., 2010; Garrick et al., 2010) y contando con mayor cobertura de la información del genoma de los organismos (Davey y Blaxter, 2010; Li et al., 2011; Lee et al., 2014). Por lo tanto, esto demanda probar si existe concordancia en los patrones filogeográficos de múltiples especies codistribuidas, suponiendo que las fuerzas evolutivas responsables han tenido efectos generalizados sobre las comunidades bióticas del Caribe Sur (Aspecto III: enfoque multiespecie, *sensu* Avice, 2009); y la existencia de divisiones profundas en múltiples árboles de genes que distinguen consistentemente los mismos conjuntos de poblaciones, suponiendo que las fuerzas evolutivas responsables han tenido efectos genómicos generalizados en las especies codistribuidas (Aspecto II: enfoque multilocus, Avice, 2009).

Para lo anterior, el Caribe Sur es una región marina que se convierte en un escenario investigativo importante para probar estos dos aspectos que han servido para responder preguntas fundamentales en otras regiones del mundo (Pelc et al., 2009; Derycke et al., 2013; Femberg et al., 2014). Por ejemplo, con el aspecto III se buscó responder cuál es el efecto de las barreras biogeográficas sobre la filogeografía de especies marinas codistribuidas, tomando en consideración la capacidad de dispersión de las especies (por la presencia/ausencia de larvas pelágicas), el requerimiento de hábitat (fondos blandos someros y litoral rocoso) y representantes de dos grupos taxonómicos (Garrick et al., 2008; Betancur et al. 2010; Miloslavich et al., 2010). Para el caso del aspecto III, se analizaron marcadores de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) disperso a lo largo del genoma para determinar las diferenciaciones genéticas de las poblaciones establecidas a cada lado de las barreras. A diferencia de los estudios anteriores, en esta tesis doctoral se seleccionaron seis especies marinas que contrastan en el periodo larval pelágico y asociadas a dos ecosistemas marinos costeros. Se seleccionaron dos especies sin larvas pelágicas: *Sciades proops* y *Melongena melongena*, asociadas a fondos blandos someros; dos con larvas pelágicas de vida corta: *Acanthemblemaria rivasi*, que habita en aguas someras de fondos rocosos y *Cittarium pica* que vive entre el infra y el mesolitoral del litoral rocoso; y dos con larvas pelágicas de vida larga: *Micropogonias furnieri* y *Nerita tessellata*, que habitan fondos blandos someros y litoral rocoso, respectivamente. Con lo anterior en mente, se plantearon las siguientes preguntas:

1. ¿La pluma del río Magdalena (PRM), la ausencia de plataforma continental en Santa Marta (SNSM) y la ausencia del fondo y litoral rocoso somero combinado con el afloramiento casi permanente en La Guajira (AFR+APG) son barreras físicas que influyen en el patrón filogeográfico de especies marinas de amplia y limitada vagilidad en el Caribe Sur?
2. ¿Cuál es el modelo poblacional de las especies marinas ante la presencia de las barreras putativas?
3. ¿Hay concordancia ente los patrones filogeográficos de las especies?
4. ¿Hay concordancia entre marcadores moleculares para definir el quiebre filogeográfico de *Cittarium pica*?

5. ¿La historia de vida larval puede predecir el patrón filogeográfico de especies marinas en el Caribe Sur?

El documento se ha estructurado en cuatro capítulos. El primero es uno de generalidades que define algunos conceptos, el área de estudio con los modelos de ecosistemas y la descripción de los modelos biológicos que se escogieron para responder las preguntas. El segundo capítulo presenta aspectos metodológicos de recolecta de muestras, procesamiento en laboratorio y procedimientos bioinformáticos para alineamiento y ensamblaje de las secuencias analizadas. En el tercer capítulo, se abordan los interrogantes del 1 al 3, mientras que el cuarto capítulo se centra en la respuesta a la pregunta 4. Por su parte, el quinto capítulo se dedica a resolver la pregunta 5.

# 1. Generalidades

## 1.1 Filogeografía

La filogeografía estudia los principios y procesos que dominan los arreglos espaciales de los linajes genéticos, especialmente dentro y entre especies (*sensu* Avise, 2000). La filogeografía considera que la gran mayoría de las especies presentan cierto grado de estructura genética asociada con la geografía (Domínguez y Vásquez, 2009). Por ejemplo, esa estructura puede ser muy compleja en especies que habitan áreas de alta actividad tectónica, volcánica o paleoclimática (Jacobs et al., 2004), o de menor complejidad, como en aquellas poblaciones que presentan altas tasas de flujo genético o cuyo aislamiento es relativamente reciente (Domínguez y Vásquez, 2009; Pelc et al., 2009). Es decir, la estructura filogeográfica de una especie refleja la interacción entre los procesos demográficos y genealógicos y la dinámica de los procesos de la tierra (geológicos, oceanográficos o climáticos). En este sentido, los trabajos de filogeografía de especies permiten identificar cómo se estructuran las poblaciones en un gradiente geográfico, cuánta información genética comparten las poblaciones entre sí, y cómo las condiciones ambientales han afectado su historia genética a través del tiempo.

Desde el punto de vista molecular, la filogeografía tomó forma como disciplina cuando Avise et al. (1987) observaron que clados de algunos árboles de genes intraespecíficos mostraban un patrón geográfico. Las correlaciones entre las genealogías de genes y la geografía podían referirse simplemente como patrones filogeográficos (Avise et al., 1987). La forma como se aborda la filogeografía hace que sea considerada como una subdisciplina de la biogeografía histórica, la cual integra conceptos y técnicas de biología molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática, filogenética, etología y paleontología (Avise, 2000); o bien es mencionada como parte de la biología evolutiva, siendo un puente entre la microevolución (relaciones tocogenéticas= relaciones entre individuos de una misma especie) y la macroevolución (relaciones jerárquicas= relaciones entre especies).

La filogeografía comparada estudia los efectos de la historia y la biogeografía en la distribución de la variación genética de varias especies de una comunidad. Es decir, son estudios filogeográficos regionales que consideran los patrones espaciales de los linajes de múltiples taxones codistribuidos (*sensu* Vásquez, 2009). El alcance que pueden dar estos estudios es mayor, dado que permiten evaluar las asociaciones entre procesos poblacionales de diferentes taxones que han evolucionado independientemente, pero

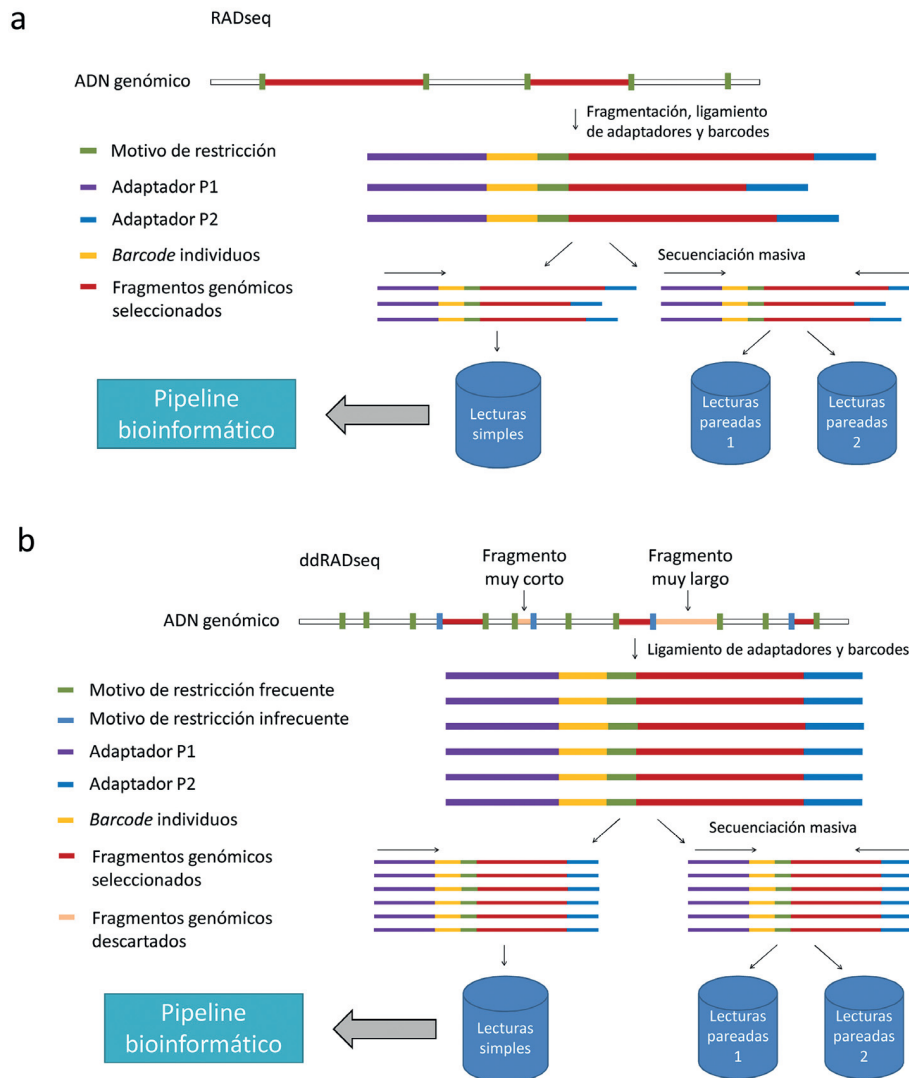
que coinciden en los patrones regionales filogeográficos, lo que se considera como una prueba de la influencia de factores ecológicos y evolutivos en la estructura y distribución actual de las especies involucradas (Aspecto III: enfoque multiespecie, *sensu* Avise, 2009; Vázquez, 2009).

Desde que iniciaron los estudios filogeográficos en animales, las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) se convirtieron en la fuente de información. Su bondad está en presentar una alta tasa de mutación, no recombina como el ADN nuclear y su herencia es casi exclusivamente materna (Avise, 2000; Lanteri y Confalonieri, 2003). Las variantes del ADNmt son denominadas haplotipos y pueden registrar la historia maternal de eventos mutacionales, los cuales pueden conectarse filogenéticamente en un filograma o árbol de genes (Avise, 2000, 2009). De manera práctica, el filograma se superpone con la distribución geográfica de las poblaciones de estudio, lo que permite identificar una descripción de la reconstrucción filogeográfica (Avise, 2000). Desde que se implementó la filogeografía como disciplina, se han propuesto varias formas de hacer los análisis gráficos, los cuales incorporan los árboles de genes (filogramas), el modelo evolutivo de coalescencia y valores estadísticos de probabilidad (Avise, 2000; Domínguez y Vázquez et al. 2009).

A pesar de lo anterior, en los años recientes se vienen implementando para los estudios de filogeografía los métodos de genotipificación por secuencia, los cuales consisten en reducir la complejidad del genoma utilizando enzimas de restricción y los fragmentos resultantes pasan por secuenciación de nueva generación. El uso inicial de estas técnicas está en la genómica de poblaciones, una rama de la genética que se enfoca en el estudio del material genético de grupos de individuos de una misma especie, con el objetivo de comprender la variabilidad genética, la estructura poblacional y los patrones de evolución que ocurren dentro de una población. Por esta razón, la genómica de poblaciones ha realizado un importante aporte a la filogeografía comparada al proporcionar una visión más detallada y completa de la evolución y la historia demográfica de las especies por medio del uso de los métodos de genotipificación por secuenciación (Edwards et al., 2021). Estos métodos dan la oportunidad de descubrir y genotipificar un gran número de marcadores de tipo SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) para cada especie evaluada en su ámbito geográfico (Aspecto II: enfoque multilocus, Avise, 2009). Los SNP son marcadores bialélicos que se producen por la sustitución de una sola base de ADN por otra en una ubicación específica del genoma. Por ejemplo, si en una población, la mayoría de los individuos tienen la secuencia de ADN "CGTTACC" en una cierta posición, y algunos individuos tienen la secuencia "CGTTICC" en esa misma posición, entonces hay un SNP presente. Así que se considera que los SNPs son variaciones comunes en el genoma y pueden afectar la función y expresión de los genes. También se considera que la acumulación de varios cambios en los SNPs entre individuos de diferentes lugares define la existencia y el nivel de división poblacional (López de Heredia, 2016).

Entre los métodos de genotipificación por secuenciación está la secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción (Rad-seq; McCormack et al., 2013), el cual consiste en secuenciar fragmentos cortos de ADN a lo largo del genoma que son reconocidos por una enzima de restricción específica. De ese método surgió el de doble digestión (ddRADseq), que se desarrolla con una doble digestión de dos enzimas de restricción: una a cada extremo del fragmento (una de corte frecuente y otra de corte raro; Figura 1-1; López de Heredia, 2016). Trae su ventaja porque reduce en costos y coberturas la librería genómica; permite seleccionar el tamaño de los fragmentos que se van a secuenciar para poder organizar las diferentes regiones tomadas al azar, y representar una fracción del genoma completo (Peterson *et al.*, 2012). Con la tecnología de NGS y el apoyo de la bioinformática se pueden comparar los genomas parciales de varios individuos de diferentes poblaciones a través de los SNPs para resolver con mayor resolución preguntas en el campo de la genómica de poblaciones, filogeografía y filogenética de los organismos (Eguiarte et al, 2013; Boehm et al., 2015; Edwards et al., 2021). El proceso de ddRAD-seq se puede resumir en los siguientes pasos (Figura 1-1):

- Extracción de ADN: Se extrae el ADN de los individuos de la población de interés.
- Cortes enzimáticos: El ADN se corta en fragmentos utilizando enzimas de restricción específicas, una de corte frecuente y otra de corte raro. Estas enzimas de restricción cortan el ADN en secuencias específicas llamadas "sitios de restricción".
- Adición de adaptadores: Se agregan adaptadores a los fragmentos de ADN cortados. Los adaptadores son secuencias cortas que permiten la unión de los fragmentos a la plataforma de secuenciación.
- Amplificación de fragmentos: Los fragmentos de ADN marcados con adaptadores se amplifican mediante la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta amplificación permite obtener suficiente cantidad de ADN para la secuenciación.
- Purificación y selección de fragmentos: Se purifica y selecciona los fragmentos de ADN amplificados para obtener una biblioteca de fragmentos que se puedan secuenciar.
- Secuenciación: La biblioteca de fragmentos seleccionados se somete a secuenciación de próxima generación. Los fragmentos se secuencian masivamente en paralelo, lo que permite obtener millones de secuencias cortas en una sola corrida.



**Figura 1-1.** Esquema de las metodologías de genotipado RAD-seq (a) y ddRAD-seq (b). Tomado de López de Heredia (2016).

## 1.2 Barreras biogeográficas

Las barreras biogeográficas son consideradas como el factor que limita el proceso de dispersión de los organismos, impidiéndoles colonizar otros lugares o conectarse genéticamente con otras poblaciones. Así pues, las barreras permiten la diferenciación genética y evitan la homogeneización del flujo de genes dentro del rango de distribución de una especie, siendo el flujo genético el intercambio de material genético entre dos poblaciones a partir del movimiento de individuos de un lugar a otro y con éxito reproductivo del inmigrante (Harlt y Clarck, 1997).

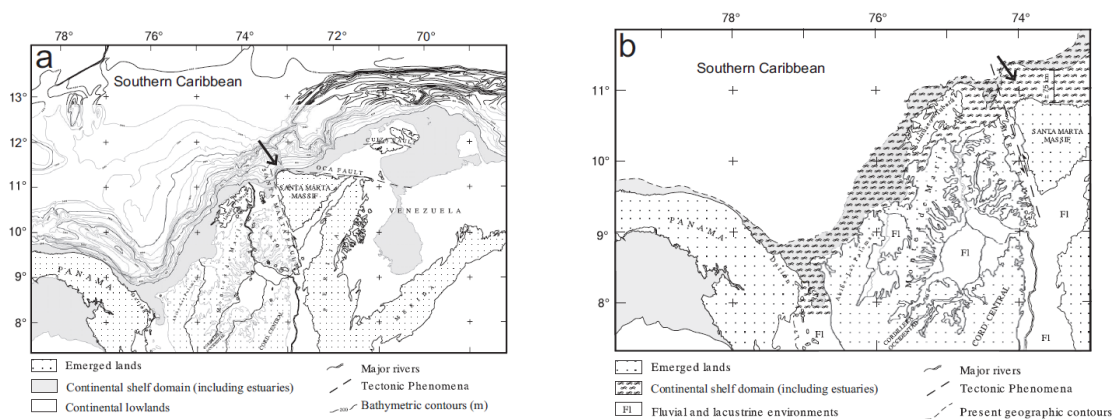


En el ambiente marino, se tienen dos tipos de barreras: las duras, que físicamente separan las poblaciones marinas (por ejemplo, el Istmo de Panamá; Cowman y Bellwood, 2013) y las blandas o permeables, que implican procesos hidrológicos, como las corrientes marinas, gradientes de las propiedades físicas y químicas del agua del mar en el sector costero o las grandes distancias, que limitan la dispersión de los organismos adultos o en la fase larval (Luiz et al., 2012). Un ejemplo, es la gran extensión de agua oceánica profunda entre el continente africano y americano; ó las plumas de los ríos Amazonas y Orinoco (Silva et al., 2018).

### 1.2.1 Sur del Caribe como modelo de estudio de filogeografía comparada

En este estudio sólo se contempló la porción de la línea costera y el mar territorial de Colombia, donde se presentan las ecorregiones Caribe sur y suroccidente. La primera contempla la península de La Guajira hasta el Parque Nacional Natural Tayrona (PNNTayrona) (Villamizar y Cervigón, 2017) y la segunda desde Santa Marta hasta Cabo Tiburón (aunque incluye Panamá, Costa Rica y Nicaragua; Spalding et al., 2007). La parte de Colombia se caracteriza por tener una historia geológica que se caracteriza por presentar diferentes sucesos de cambios en la geomorfología de la línea costera debido a la variación del nivel del mar durante el último periodo de glaciación y al levantamiento de los sistemas montañosos de la cuenca Caribe, entre ellas la de Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) (**Figura 1-2**). Los estudios geológicos de la SNSM indican que la falla Santa Marta fue la responsable de colocarla en la posición actual y la estimación que se tiene de este hecho ocurrió hace 0.75 millones de años (Betancur et al., 2010). Esto cambió en más de una ocasión la plataforma continental y la ubicación de la desembocadura del río Magdalena (Flórez, 2003). Por ejemplo, hace dos millones de años, durante el Plioceno, la desembocadura se ubicó inicialmente en Riohacha al oriente de la SNSM y luego migró hacia el occidente, hasta ubicarse en Galerazamba. Durante el Pleistoceno (entre 2 millones y 10 mil años) se trasladó hacia el sector de Cartagena y al final de este periodo hacia Barranquilla hasta alcanzar la ubicación actual.

Producto de lo anterior, el Caribe colombiano presenta una condición ambiental evidente en una estratificación en la temperatura, donde los valores varían de menor a mayor desde La Guajira hacia al suroccidente (Bernal et al., 2006; Gómez y Acero, 2020). Este contraste ambiental está explicado por el afloramiento semi permanente en La Guajira que disminuye la temperatura (<25°C) de las aguas hasta el sector de Santa Marta y aumenta a partir del oeste de esta última hasta el suroeste del Caribe de Colombia (>29°C). Con respecto a la salinidad, se observa un gradiente inverso en los valores, donde el contraste ocurre desde el oriente de Santa Marta hacia el suroccidente del litoral debido a las descargas de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato (Lozano et al., 2010).



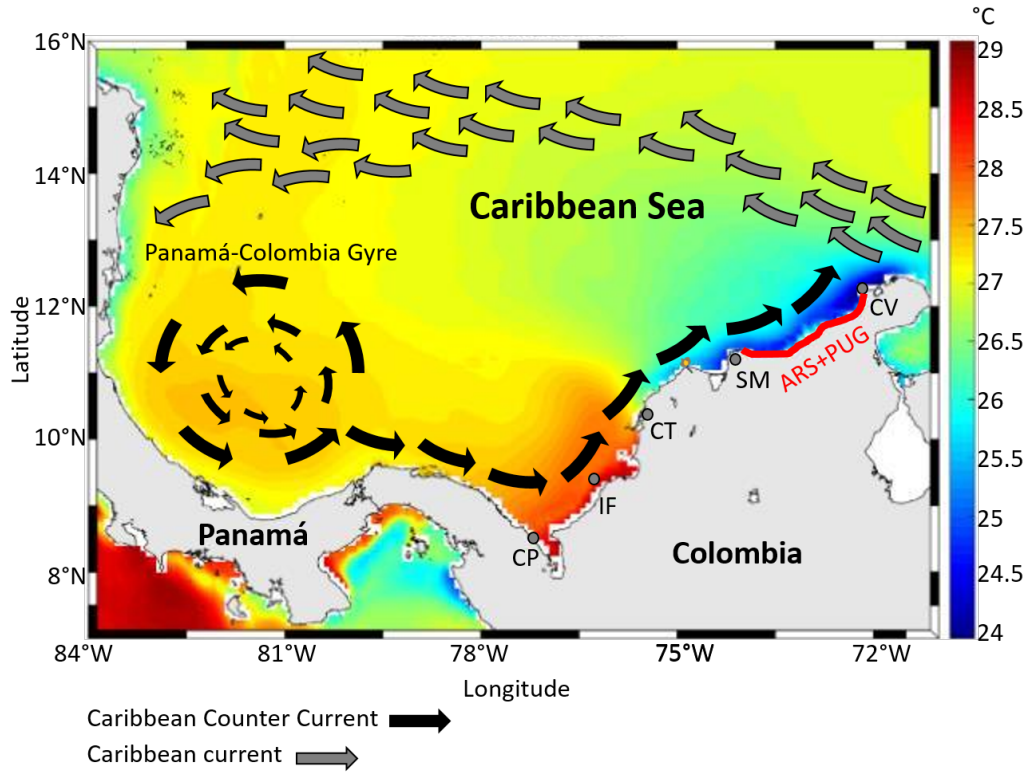
**Figura 1-2.** Cambios de la plataforma continental del suroeste del Caribe antes (a) y después (b) del desplazamiento de la Sierra Nevada de Santa Marta (tomado de Betancur et al., 2010).

Entre las dos ecorregiones del sur del Caribe que cubren a Colombia predominan dos corrientes superficiales: la Corriente Caribe (CC) se origina en la Corriente del Norte de Brasil y fluye de este a oeste, llevando aguas cálidas superficiales al Golfo de Venezuela y al Mar Caribe Central. Esta corriente tiene su influencia en la Península colombiana de La Guajira. A estas masas de agua se suman las costeras del resto de la península, que se desplazan hacia mar afuera producto del afloramiento semi permanente que ocurre en la plataforma de La Guajira (Orfila et al, 2021). Basado en datos de temperatura superficial del mar, este afloramiento tiene incidencia hasta el lado oriental de Santa Marta, principalmente durante los meses de alta intensidad de los vientos alisios del norte (Andrade, 2001; Orfila et al. 2021).

Una segunda corriente superficial es la Contracorriente Caribe (CCC; también conocida como la contracorriente Panamá-Colombia), que deriva del Giro Panamá-Colombia (Andrade, 2001). El dominio de cada condición oceanográfica mencionada depende del comportamiento de los vientos alisios del norte (Bernal et al., 2006; Andrade, 2001; Gómez y Acero, 2021). Por ejemplo, durante la época seca (diciembre/julio) los alisios son más intensos y cierran el brazo norte del Giro, disminuyendo su intensidad y en consecuencia la de la CCC; mientras que en época de lluvias (agosto-noviembre), con el debilitamiento de los alisios, el Giro se retira de la parte Este y las aguas superficiales se mueven hacia el Norte y Nororiente hasta el frente del litoral sur de La Guajira (Andrade, 2001; **Figura 1-3**).

Con relación a los ecosistemas marinos seleccionados, el litoral rocoso presenta una distribución heterogénea a lo largo del suroccidente del Caribe. De los 601 km existentes en Colombia, el litoral rocoso predomina en los departamentos de Bolívar (147 km lineales), La Guajira (134 km) y Magdalena (119 km; Posada-Posada y Henao-Pineda, 2007). En la Guajira tiene dominio en el norte de la península (desde el Cabo de la Vela hasta Puerto López) y se ausenta hasta el límite con el departamento del Magdalena, en una distancia de aproximadamente de 300 km. Respecto a los fondos blandos someros, la distribución es casi homogénea, excepto en el sector del Parque Nacional Natural

Tayrona, donde se estrecha la plataforma continental producto de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (**Figura 1-2**). Resalta La Guajira por tener una plataforma continental más ancha, larga y somera que cuenta con un área aproximada de 14298 km<sup>2</sup> (Álvarez-León et al., 1995).



**Figura 1-3.** Principales corrientes del sur del Mar Caribe. Tomado del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas (Pronóstico Climático del Caribe Colombiano No. 83, [www.cioh.org.co](http://www.cioh.org.co)). Esquemas de las corrientes son basados en Andrade (2001).






## 1.2. Descripción de los modelos biológicos escogidos


La historia de vida de un organismo está constituida por aquellos aspectos de su ciclo de vida que afectan su supervivencia y su reproducción. Para esto los organismos desarrollan estrategias exitosas que les permiten experimentar procesos de adaptación al medio natural dándoles así una mayor supervivencia y proliferación (Martínez-Gómez, 2012). En el ambiente marino los organismos tienen estrategias para lograr sobreponerse a las barreras biogeográficas y así poder proliferar. Por ejemplo, luego que ha ocurrido el desarrollo embrionario, pueden convertirse en una larva o en un individuo juvenil. El desarrollo larval es la más común en organismos marinos y es la estrategia que aumenta la capacidad de dispersión, convirtiéndolos en organismos vágiles. A los que pasan del embrión al estado de juvenil, tienen un desarrollo directo y es la estrategia menos común, definiéndolos como organismos de limitada vagilidad. A estos se le suman aquellos

organismos que también tienen una fase larval pero que, por alguna estrategia adicional, como el cuidado parental, la larva no tiene una vida pelágica.

Para este estudio se seleccionaron seis especies que contrastan en historias de vida en la capacidad de dispersión y asociadas a dos ecosistemas marinos costeros (**Tabla 1-1**): tres de fondos rocosos someros: *Acanthemblemaria rivasi* (con larva pelágica de 22 días de duración; Acero, 1984; Johnson y Brothers, 1989), *Cittarium pica* (con larva pelágica < 6 días; Bell, 1997; Velazco y Barros, 2017) y *Nerita tessellata* (con larva pelágica >90 días; Underwood, 1975; Waters et al., 2005; Reisser et al., 2014). Las otras tres especies son de fondos blandos de aguas someras: *Melongena melongena* (sin larva pelágica; Clench y Turner, 1956; Hernández y Stotz, 2004); *Sciades proops* (sin larva pelágica y cuidado parental; Bruton, 1996; Acero, 2003). *Micropogonias furnieri* (con larva pelágica de 30 a 50 días; Fabiano et al., 2016).

**Tabla 1-1.** Especies modelo del estudio, describiendo el nombre del hábitat, grupo taxonómico, tipo de fecundación, tipo de cuidado de las crías e historia de vida larval.

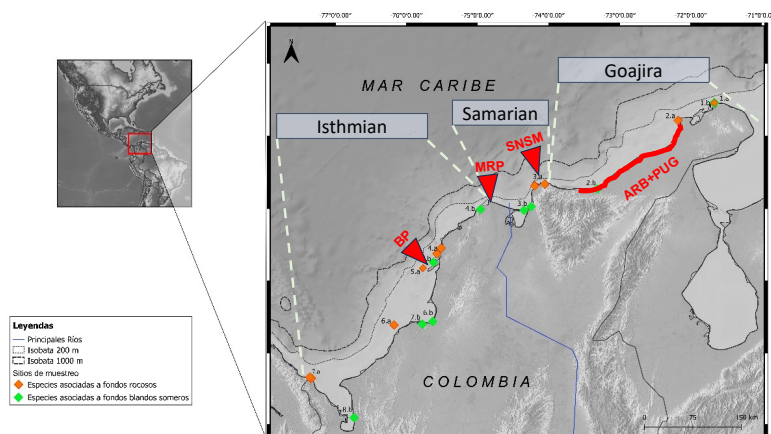
Háb.	Especie	Ecología	Grupo taxonómico	Fecundación	Tipo de cuidado	Historia de vida larval	Imagen
Fondo rocoso somero	<i>Cittarium pica</i> Nombre común: Burgao, Cigüa	Infra/mesolitoral rocoso	Molusco	Externa	No aplica	Larva pelágica de vida corta (3-6 días) Bell (1997); Velazco y Barros (2017)	 Foto: Osorno et al. (2009)
	<i>Acanthemblemaria rivasi</i> Nombre común: Tubícola mandíbula manchada	Habita en arrecifes con profundidades de 0 a 10 m; en orificios de esqueletos de balanos rodeados de <i>Millepora</i> ; en orificios de corales <i>Millepora</i> o <i>Acropora palmata</i>	Pez	Externa	Parental de huevos	Larva pelágica de vida media (22-25 días) Acero (1984); Johnson y Brothers (1989)	 Foto: Infante (2021)
	<i>Nerita tessellata</i> Nombre común: caracol nerita	Habita en el mesolitoral rocoso	Molusco	Externa	No aplica	Larva pelágica de vida larga (>60 días) Underwood (1975); Waters et al. (2005); Reisser et al. (2014)	 Foto: Udo Schmidt
Fondo blanco somero	<i>Sciades proops</i> Nombre común: Chivo mozo	Habita de 0 a 10 m de profundidad del sector marino; en lagunas costeras o desembocaduras de ríos	Pez	Externa	Incubación bucal de huevos Parental de larvas	Sin larva pelágica Bruton (1996); Acero (2003)	 Foto: Fishbase
	<i>Melongena melongena</i> Nombre común: caracol copey; pata e' burro.	Habita de 0 a 5 m de profundidad del sector marino en o cerca de lagunas costeras o estuarios	Molusco	Interna	Ovicápsulas	Sin larva pelágica, pero se suspende en el agua hasta 2 días; larva lecitotrófica (rápida transformación a la etapa juvenil) Clench y Turner	 Foto: Frank Weffer

Háb.	Especie	Ecología	Grupo taxonómico	Fecundación	Tipo de cuidado	Historia de vida larval	Imagen
						(1956); Hernández y Stotz (2004)	
	<i>Micropogonias furnieri</i> Nombre común: corvina blanca/coroncoro/pacora	Habita de 0 a 10 m de profundidad en el sector marino, cerca de lagunas costeras, estuarios o desembocaduras de ríos	Pez	Externa	No hay	Larva pelágica de vida larga (30-50 días)	 Fabiano et al., (2016) Foto: Fishbase

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Recolecta de las muestras

Se recolectaron 20 especímenes por cada área de muestreo para las seis especies escogidas. Para las especies de fondos blandos someros, la recolección de muestras se hizo en los sitios de desembarque con apoyo de pescadores que utilizan redes de enmalle y palangres; las embarcaciones fueron escogidas al azar en cada sitio. Para el caso de las de fondos rocosos, los muestreos se hicieron con buceo autónomo, haciendo recolecciones manuales y utilizando nasas. Las muestras del tejido del pie (moluscos) y aleta (peces) fueron fijadas en etanol al 96% en tubos de 2 ml. Los especímenes se recolectaron dentro de una longitud de 10 km (**Figura 2-1; Tabla 2-1**). Para las especies de fondos rocosos someros se tienen los sitios: Punta Gallinas (1a, n=20), Cabo de la Vela (2a, n=20), Santa Marta-PNN Tayrona (3a, n=20), Cartagena (4a, n=20)-PNN Corales del Rosario (5a, n=20), Isla Fuerte (6a, n=20) y Capurganá-Sapzurro (7a, n=20). Para las especies de fondos blandos someros: Punta Gallinas (1b, n=20), Dibulla (2b, n=20), Golfo de Salamanca (3b, n=20), Puerto Colombia (4b, n=20), Cartagena (5b, n=20), Tolú-Coveñas (6b, n=20), bahía de Cispatá (7b, n=20) y Turbo (8b, n=20).



**Figura 2-1.** Mapa del área de estudio. Los rombos indican las áreas de muestreo (los números con literal a y de color naranja: fondos rocosos; los números con literal b y de color verde: fondos blandos) y los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú). En la tabla 2-1 se describen los nombres de cada sitio. Subareas según Díaz (1995).

**Tabla 2-1.** Sitios de muestreos, coordenadas y número de muestras para cada una de las especies estudiadas en los tipos de ecosistemas someros del Caribe de Colombia.

<b>Especies asociadas a fondos rocosos someros</b>				
<b>Sitios de muestreos</b>	<b>Coordenadas</b>	<b><i>Cittarium pica</i></b>	<b><i>Acanthemblemaria rivasi</i></b>	<b><i>Nerita tessellata</i></b>
Punta Gallinas (1a)	12°27'29.3"N 71°39'59.6"W			10
Cabo de la Vela (2a)	12°12'58.0"N 72°10'41.1"W	24	20	10
Santa Marta-PNN Tayrona (3a)	11°18'51.6"N 74°11'39.1"W- 11°20'17.7"N 74°03'14.2"W	192	22	20
Cartagena (4a)- PNN Corales (5a)	10°22'29.3"N 75°34'16.9"W- 10°15'22.2"N 75°37'04.5"W- 10°10'31.2"N 75°46'07.1"W	64	20	20
Isla Fuerte (6a)	9°23'15.4"N 76°10'23.6"W	57	17	20
Capurganá-Sapzurro (7a)	8°38'30.6"N 77°20'45.0"W- 8°38'40.4"N 77°20'14.6"W- 8°39'40.6"N 77°21'40.3"W	23	20	20
<b>Total</b>		<b>360</b>	<b>99</b>	<b>100</b>
<b>Especies asociadas a fondos blandos someros</b>				
<b>Sitios de muestreos</b>	<b>Coordenadas</b>	<b><i>Sciades proops</i></b>	<b><i>Melongena melongena</i></b>	<b><i>Micropogonias furnieri</i></b>
Punta Gallinas (1b)	12°27'29.3"N 71°39'59.6"W		20	
Dibulla (2b)	11°16'27.0"N 73°18'52.9"W	20		20
Isla de Salamanca (3b)	10°58'36.5"N 74°20'46.3"W- 11°01'39.2"N 74°14'39.8"W	20	20	20
Puerto Colombia (4b)	10°59'22.3"N 74°57'35.0"W	20	20	
Cartagena (5b)	10°27'17.6"N 75°30'47.2"W	20	20	20
Tolú-Coveñas (6b)	9°26'06.5"N 75°37'47.3"W		20	
Cispatá (7b)	9°23'54.0"N 75°46'39.2"W	20		20
Turbo (8b)	8°05'49.3"N 76°44'24.5"W	20	20	20
<b>Total</b>		<b>120</b>	<b>120</b>	<b>100</b>



## 2.2 Trabajo en laboratorio

La técnica ddRad-seq se desarrolló para las seis especies a partir de los servicios ofrecidos por Australian Genome Research Facility y el Centro de Genética y Biología Molecular de la Universidad del Magdalena. Debido a que el requerimiento en cuanto a calidad y concentración de ADN es muy alto para los estudios genómicos, estos centros garantizaron el proceso de extracción de ADN, el servicio de estandarización de la técnica ddRad-seq para identificar para cada especie las mejores enzimas de restricción que ofrecieron la mayor resolución en cobertura del genoma. Este proceso de estandarización consistió en probar ocho pares de combinaciones de enzimas de restricción con el ADN de tres muestras escogidas al azar para cada una de las especies. Las combinaciones utilizadas fueron PstI/MspI, Pst/MseI, Pst/NlaIII, Pst/HpyCh4IV, EcoRI/MspI, EcoRI/MseI, EcoRI/NlaIII y EcoRI/HpyCh4IV. La librería generada de este proceso de estandarización fue secuenciada en la plataforma Illumina MiSeq. La ventana de tamaño de pares de bases seleccionada para producir los Rad-seq fue de 280bp - 375bp. Esto buscó obtener un mayor número de loci entre todas las muestras recolectadas en todos los sitios. El criterio de selección de la combinación óptima de enzimas está basado en dos factores: la ausencia de regiones repetidas entre 280 y 375 pb que puedan ser visibles en el gel y la alta amplificación de fragmentos en ese ámbito de pares de bases, verificada en el electrofenograma. Teniendo en cuenta lo anterior, la mejor combinación de enzima para cada especie fue: *Acanthemblemaria rivasi*, EcoRI y HpyCh4IV; *Cittarium pica*, EcoRI y NlaIII; *Nerita tessellata*, EcoRI y HpyCh4IV; *Sciades proops*, PstI y MseI; *Melongena melongena*, EcoRI y HpyCh4IV; *Micropogonias furnieri*, PstI y MseI. Luego de la identificación del par de enzimas se procedió con el resto de las muestras, preparando las librerías y secuenciándolas con lecturas de 150bp single end en la plataforma illumina NextSeq. El proceso se llevó a cabo por tandas de 95 con un control negativo.

## 2.3 Ensamblaje de las secuencias

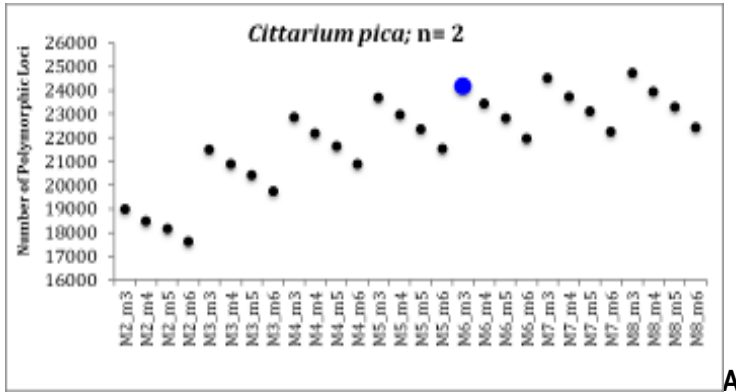
Las secuencias se demultiplexaron y filtraron para obtener la mejor calidad de datos, se utilizó el programa STACK a través del comando 'process\_radtags' en STACKS v2 (Catchen et al., 2011; 2013). Se eliminó cualquier par de lecturas con bases incorrectas, que tuviese un puntaje de baja calidad y/o un código de barras o sitio de corte con más de una falta de coincidencia utilizando el algoritmo "'process\_radtags'. Para el caso de la técnica ddRad-seq, previo al ensamblaje de las secuencias, se determinaron los parámetros de ensamblaje ( $n$ : número de desajustes permitidos entre loci dentro del catálogo;  $m$ : profundidad mínima de cobertura requerida para crear los agrupamientos; y  $M$ : número de desajustes permitidos entre loci dentro de los individuos; Catchen et al., 2011) con el programa computacional RADProc (Nadukkalam Ravindran et al., 2019). El proceso fue llevado a cabo ejecutando el script propuesto por los autores, de manera que

para cada especie se seleccionaron los 20 individuos con la mayor cantidad de reads (cuatro por sitio). Las combinaciones evaluadas fueron modificando de 3 a 6 los valores de  $m$ , de 2 a 8 los de  $M$  y fijando a  $n$  en 1. Luego se repitió el proceso fijando a  $n$  en 2.

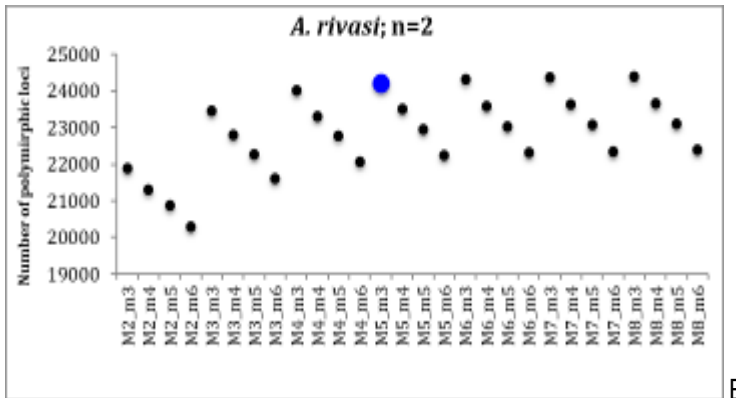
Los resultados fueron graficados para determinar el promedio del número de loci, número de loci polimórficos y número de SNPs para cada combinación de los parámetros  $n$ ,  $M$  y  $m$ , determinando así los mayores valores (Paris et al., 2017). La combinación de parámetros con un alto número de loci polimórficos para *A. rivasi* fue  $M=5$ ,  $m=3$  y  $n=2$ ; en *C. pica* fue  $M=6$ ,  $m=3$  y  $n=2$ ; en *N. tessellata*  $M=6$ ,  $m=3$ ,  $n=2$ ; en *M. melongena* fue  $M=5$ ,  $m=3$  y  $n=2$ ; en *S. proops* fue  $M=3$ ,  $m=4$ ,  $n=1$  y *M. furnieri* fue  $M=6$ ,  $m=3$ ,  $n=1$  (**Figure 2-2**). Estos parámetros fueron utilizados en el ensamblaje de las secuencias de cada especie utilizando los recursos bioinformáticos de los clústeres de la Universidad de Oklahoma y Universidad de Puerto Rico.

En ausencia de un genoma de referencia, los loci RAD se ensamblaron *de novo* utilizando la opción '*denovo\_map*' en STACKS (Catchen et al., 2013). Para crear el archivo de genotipo filtrado final, se aplicaron los siguientes filtros: se determinó un porcentaje mínimo de individuos en las poblaciones requeridos para procesar un locus ( $-R = 0.8$ ) equivalente a 80% (excepto para *M. furnieri*, que fue del 0,65) y una frecuencia de alelo menor (MAF) ( $--min\_maf = 0,02$ ). Para minimizar los efectos negativos de los datos faltantes al calcular los parámetros de distancia genética basados en la frecuencia, sólo se retuvo un único SNP en cada locus ( $--write\_single\_snp$ ). Los individuos que tuvieron menos del 95% de los SNPs genotificados fueron removidos de las matrices de cada especie. El archivo .vcf resultante se utilizó para los análisis de genómica de poblaciones y estadígrafos. También se convirtió el archivo en otros formatos utilizando el programa PGDSpider v2.1 (Lischer y Excoffier, 2012).

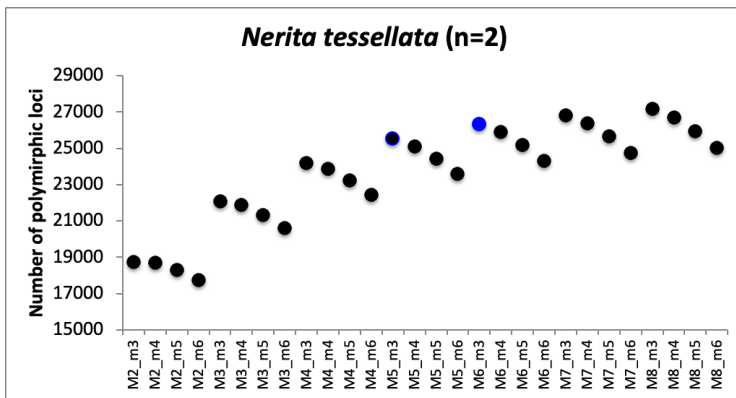
Previo a la ejecución de todos los análisis, para cada matriz de SNPs se realizó un análisis de barrido para detectar los loci bajo selección utilizando el software BayeScan v2.1 (Foll y Gaggiotti, 2008), con probabilidades previas de 10:1 para el modelo neutral y 20 ejecuciones piloto que consistían en 5000 iteraciones cada una, seguidas de 100000 iteraciones con una longitud de quemado de 50000 iteraciones. Como resultado se observó que todos los SNPs retenidos para cada especie no están sujetos a ningún tipo de selección (**Anexo 1**). Por lo tanto, los análisis se realizaron con una matriz de loci neutrales.



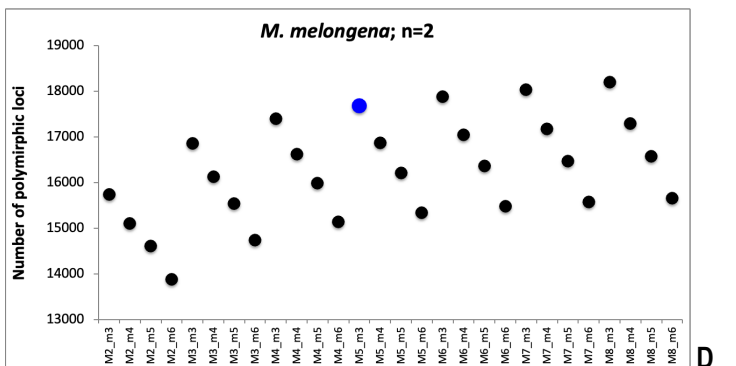
A



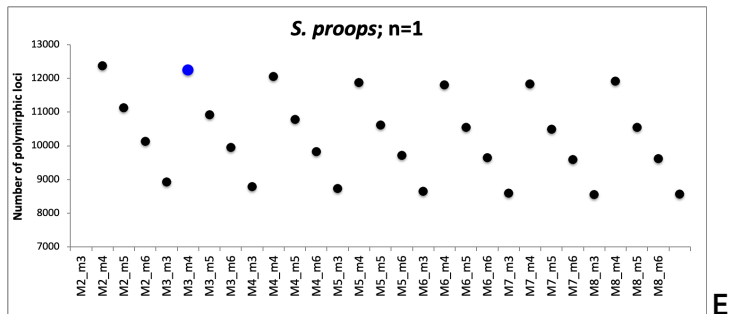
B



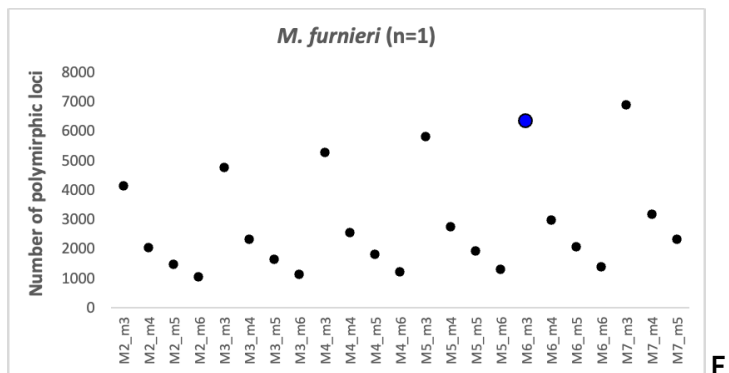
C



D



E



F

**Figura 2-2.** Gráficas de las diferentes combinaciones de los parámetros de ensamblaje para *C. pica* (A), *A. rivasi* (B), *N. tessellata* (C), *M. melongena* (D), *S. proops* (E) y *M. furnieri* (F). El punto azul es la combinación seleccionada para ensamblar las secuencias de cada especie.

# 3. Filogeografía comparada de especies marinas que contrastan en historias de vida larval ante barreras putativas del Caribe Sur<sup>1</sup>

## 3.1 Resumen

Se evaluó la filogeografía comparada de especies marinas con amplia y limitada dispersión en el Caribe sur (sector Colombia) ante la presencia de barreras putativas: pluma del río Magdalena (PRM) y estrechamiento de la plataforma continental debido a la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM). Se seleccionaron seis especies marinas, tres de fondos rocosos: *Acanthemblemaria rivasi* (con larva pelágica <22 días), *Cittarium pica* (con larva pelágica de ida corta <6 días) y *Nerita tessellata* (con larva pelágica >60 días). Tres especies de aguas someras de fondos blandos también fueron escogidas: *Melongena melongena* (sin larva pelágica), *Sciades proops* (sin larva pelágica y cuidado parental) y *Micropogonias furnieri* (larva pelágica >30 días). Se utilizó la técnica ddRad-seq para analizar SNPs de las seis especies. Se recolectaron muestras de cada especie desde La Guajira hasta el Golfo de Urabá y Capurganá para evaluar la importancia relativa de las barreras biogeográficas. Los análisis de diferenciación genética, de varianza molecular (AMOVA), PCA y los filogenéticos sugieren que cuatro especies se

---

<sup>1</sup> Parte de este capítulo fue publicado en la revista *Animals* **Narváez-Barandica, J.C.**; Quintero-Galvis, J.F.; Aguirre-Pabón, J.C.; Castro, L.R.; Betancur, R.; Acero P., A. (2023) A Comparative Phylogeography of Three Marine Species with Different PLD Modes Reveals Two Genetic Breaks across the Southern Caribbean Sea. *Animals*, 13(15), 2528; <https://doi.org/10.3390/ani13152528>

También fue aceptado para publicación en el *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*: Quintero-Galvis, J.F., Ocampo-Zuleta, K., Castro-García, L., **Narváez-Barandica, J. C.**, (in press) Limited population genetic structure in the littoral gastropod *Nerita tessellata* (Neritimorpha, Neritidae) suggests high dispersal across the Caribbean Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, xxx,xxx.

ajustan al modelo de cambio genético abrupto ante una barrera biogeográfica. Así que por primera vez se suministra suficiente evidencia de un quiebre filogeográfico causado por PRM, principalmente para *A. rivasi*. Esto supone que PRM debe estar actuando como barrera biogeográfica para especies marinas que tienen limitación en su dispersión. El otro hallazgo fue el efecto combinado que causa la ausencia del fondo y litoral rocoso somero en una distancia de línea de costa por encima de 300 km, ubicada entre el Cabo de la Vela y el sector de Santa Marta y el afloramiento semi permanente en La Guajira (AFR+APG), la cual opera para *A. rivasi* y *C. pica*. En lo que respecta a las especies de fondo blandos, se observó la influencia de SNSM y de factores ecológicos y oceanográficos sobre una ruptura genética entre Dibulla/Punta Gallinas e isla de Salamanca para *M. melongena* y *S. proops*. El análisis bayesiano permitió identificar tres poblaciones ( $K=3$ ) en la mayoría de las especies tanto las de fondos rocosos como las de fondos blandos, excepto para *N. tessellata* y *M. furnieri*, las cuales presentaron una sola población y se ajustan al modelo de panmixia ( $K=1$ ). Las otras cuatro especies se ajustaron al modelo jerárquico de poblaciones. El análisis de congruencia filogeográfica se determinó sólo en la comparación *A. rivasi*-*C. pica*.

### 3.2 Introducción

Al considerarse el océano un ambiente continuo y un sistema abierto puede suponerse que las especies marinas presentan conectividad genética a lo largo de su distribución. Son las corrientes las que influyen en el flujo genético entre sus poblaciones (Hellberg et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de estudios han demostrado que las especies marinas presentan un nivel de subdivisión genética poblacional como respuestas a factores históricos, geológicos o ecológicos-oceanográficos, pero de manera segregativa en taxones que contrastan en historias de vida (Cowen, 2002; Hellberg et al., 2002; Crandall et al., 2008; Avise, 2009; Ayre et al., 2009; Pelc et al., 2009; Derycke et al., 2013; Crandall et al., 2014; Fenberg et al., 2014; Villamor et al., 2014; Mattos et al., 2019). Una combinación de esos factores y rasgos biológicos (aspectos de la biología reproductiva) y ecológicos (aspectos del hábitat) de las especies permite entender la estructura filogeográfica y genética de los organismos marinos (Cowen, 2002; Rocha, 2003; Ayre et al., 2009; Pelc et al., 2009; Fenberg et al., 2014; Hays et al., 2014; Dalongeville et al., 2016; Fratini et al., 2016; Krueck et al., 2020). En los casos de especies que exhiben quiebres filogeográficos (Hellberg et al., 2002), los factores físicos, como las barreras blandas o permeables, son a las que se les atribuyen las causas de esa condición. Estas barreras implican procesos hidrológicos como las corrientes marinas y gradientes de las propiedades fisicoquímicas del agua del mar en el sector costero producto de las descargas continentales de los ríos; la ausencia de hábitat específico y la geomorfología de la línea costera; incluso, las grandes distancias que limitan la dispersión de los organismos adultos o en la fase larval (Ayre et al., 2009; Pelc

et al., 2009; Luiz et al., 2012; Derycke et al., 2013; Femberg et al., 2014; Silva et al., 2018; Mattos et al., 2019).

En este estudio se propuso al sector marino de Colombia del Caribe sur como escenario investigativo para evaluar el efecto de barreras putativas sobre la filogeográfica de especies marinas que contrastan en historias de vida y que habitan en ecosistemas marinos someros de la plataforma continental. La particularidad de este sector marino es que se caracterizó por presentar diferentes sucesos históricos de cambios en la geomorfología de la línea costera debido a la variación del nivel del mar durante el último periodo de glaciación y al levantamiento y movimiento de los sistemas montañosos de la cuenca Caribe, como la Sierra Nevada de Santa Marta. Esto cambió en más de una ocasión la plataforma continental, la dirección de las corrientes marinas y la ubicación de la desembocadura del río Magdalena (RM; Flórez, 2003) que pudo afectar de manera general la estructura filogeográfica de la comunidad de organismos marino-costeros. Los antecedentes de estudios con datos empíricos sobre filogeografía (Taylor y Hellberg, 2003; Baums, 2005; Baums et al., 2006; Díaz-Ferguson et al., 2010; Foster et al., 2012; Porto-Hannes et al., 2014; Devlin y Baums, 2017; Loera-Padilla et al., 2021) y de modelos de dispersión larval (Cowen et al., 2006) sugieren la existencia de una ruptura en la conectividad genética de las poblaciones a ambos lados del Caribe (continental y antillano), que la ubican entre Venezuela y Colombia (Baums et al., 2005; Cowen et al., 2006; Devlin y Baums, 2017). Sin embargo, en lo que respecta al Caribe sur del sector de Colombia, se tiene como hipótesis que la pluma del río Magdalena (RM) es una barrera biogeográfica para las especies marinas (Foster et al., 2012), pero ha sido falseada (Ospina-Guerrero et al., 2008; Landínez et al., 2009; Caiafa et al., 2018; Mendoza et al., 2019; Benavides, 2020).

La otra barrera propuesta es de origen terrestre y se trata del estrechamiento de la plataforma continental que causó la estribación de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) en el sector del PNN Tayrona (Rangel e Idárraga, 2010). Hasta ahora se ha detectado que afecta a una especie de hábito demersal en aguas someras que carece de larva pelágica (Betancur et al., 2010), permitiendo inferir que afecta a especies de fondos blandos someros y sin larvas pelágicas. Una posible tercera barrera se cree que está ubicada en La Guajira (Díaz, 1995; Cowen, 2006) debido probablemente al afloramiento semi permanente que transporta masas de agua hacia el centro del mar Caribe y que podría limitar la dispersión de larvas hacia el suroeste del litoral Caribe de Colombia, siendo más relevante para especies asociadas a fondos rocosos someros, cuya distribución está limitada hasta el Cabo de la Vela.

Una tercera barrera se propuso entre los 74° y 71° Oeste, incluyendo Santa Marta y la Península de La Guajira, la cual es atribuida al proceso de afloramiento que ocurre en este sector. El afloramiento de la Península de La Guajira provoca una disminución de la temperatura del agua (menos de 25°C) hacia la región de Santa Marta; y debido a las descargas de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato la temperatura aumenta desde el oeste de Santa Marta hasta el suroeste del Caribe colombiano (más de 29°C), incidiendo también en la salinidad, con un gradiente opuesto en los valores de temperatura (Bernal

et al., 2006; Lozano et al., 2010). Para entender el proceso de afloramiento, se debe reconocer la influencia de las dos corrientes oceánicas principales que operan en el Caribe colombiano: la Corriente del Caribe (CC) y la Contracorriente Caribe (también conocida como Contracorriente Panamá-Colombia; CCC). La CC se origina en la Corriente del Norte de Brasil y fluye de este a oeste, llevando aguas cálidas superficiales al Golfo de Venezuela y al Mar Caribe Central. Esta corriente tiene su influencia en la Península colombiana de La Guajira. Por otro lado, la CCC se origina en el Giro Panamá-Colombia y desempeña un papel significativo en el transporte de agua hasta el área de Cabo de la Vela durante el debilitamiento de los vientos alisios del norte (Andrade, 2015; Bernal et al., 2006; Orfila et al., 2021). Cuando la CC y la CCC convergen cerca de la Península de La Guajira, junto con la acción de los vientos mar afuera y el efecto Coriolis, se produce un movimiento ascendente de aguas más profundas y ricas en nutrientes hacia la superficie. Las aguas superficiales son empujadas hacia mar adentro por los vientos que soplan paralelos a la costa, permitiendo que las aguas más frías y ricas en nutrientes se eleven desde las profundidades. La Península de La Guajira experimenta un fuerte afloramiento desde diciembre hasta mayo debido a los vientos alisios de alta intensidad, con efectos más débiles de junio a agosto, concentrados principalmente en el extremo norte de la Península, específicamente en Cabo de la Vela ( $\sim 72^\circ$  Oeste, Figura 1a; ver revisión en Gaspar y Acero, 2020). Por esta razón es categorizada como semi permanente. Otro evento de afloramiento ocurre entre Santa Marta y el Parque Nacional Natural Tayrona (PNN Tayrona), que es estacional y típicamente ocurre durante el pico de los vientos alisios del norte de diciembre a marzo. En ambos casos, el agua aflorada es transportada hacia el mar por corrientes superficiales y se agrega al agua llevada por la CC hacia el Caribe Central (Andrade Amaya, 2015; Correa-Ramírez et al., 2020; Gaspar & Acero, 2020), causando posiblemente un efecto disruptivo en la conectividad genética de especies marinas asociadas con arrecifes rocosos poco profundos. Esta barrera fue propuesta en el pasado con datos de simulación (Cowen et al., 2006). Sin embargo, estudios experimentales han rechazado esta hipótesis, ya que las especies asociadas con fondos rocosos y arrecifes de coral que se evaluaron tienen un alto potencial de dispersión (Benavides, 2020; Quintero-Galvis et al., en prensa) o no incluyeron muestras de la Península de La Guajira (Velasco-Montoya et al., 2022; García-Urueña et al., 2022; Ballesteros-Contreras et al., 2022).

Con lo anterior en mente, se propuso responder cuatro preguntas: 1. ¿la pluma del río Magdalena (PRM), la ausencia de plataforma continental en Santa Marta (SNSM) y la ausencia del fondo y litoral rocoso somero combinado con el afloramiento casi permanente en La Guajira (AFR+APG) son barreras físicas que influyen en el patrón filogeográfico de especies marinas de amplia y limitada vagilidad en el Caribe Sur? 2. ¿Cuál es el modelo poblacional de las especies marinas ante la presencia de las barreras putativas? 3. ¿Hay concordancia ente los patrones filogeográficos de las especies? y 4. ¿La historia de vida larval puede predecir el patrón filogeográfico de especies marinas en el Caribe Sur? para desarrollar el estudio se seleccionaron seis especies marinas buscando atender el aspecto III del enfoque multiespecie propuesto por Avise (2009).



Este enfoque motiva realizar estudios comparativos de filogeografía, considerando que los patrones espaciales de los linajes pueden ocurrir en múltiples taxones codistribuidos (Vázquez, 2009), bajo el supuesto que las fuerzas evolutivas responsables han tenido efectos generalizados sobre las comunidades (Avice, 2009; Vázquez, 2009). El otro enfoque es el del aspecto II de multilocus, que a partir de la implementación de cientos a miles de marcadores de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) distribuidos a lo largo del genoma, suponiendo que las fuerzas evolutivas responsables han tenido efectos generalizados sobre el genoma de las especies (Avice, 2009).

Así las cosas, las especies fueron seleccionadas tomando en consideración la capacidad de dispersión (por la presencia/ausencia de larvas pelágicas), el requerimiento de hábitat (fondos blandos someros y litoral rocoso) y representantes de dos grupos taxonómicos (Garrick et al., 2008; Betancur et al. 2010; Miloslavich et al., 2010). Tres especies son de fondos rocosos someros: el pez *Acanthemblemaria rivasi* (con larva pelágica de 22 días de duración; Acero, 1984; Johnson y Brothers, 1989) y los caracoles de *Cittarium pica* (con larva pelágica < 6 días; Bell, 1997; Velazco y Barros, 2017) y *Nerita tessellata* (con larva pelágica >90 días; Underwood, 1975; Waters et al., 2005; Reisser et al., 2013). Las otras tres especies son de fondos blandos de aguas someras: el caracol *Melongena melongena* (sin larva pelágica; Clench y Turner, 1956; Hernández y Stotz, 2004); el pez *Sciades proops* (sin larva pelágica y cuidado parental; Bruton, 1996; Acero, 2003) y el pez *Micropogonias furnieri* (con larva pelágica de 30 a 50 días; Fabiano et al., 2016).

### 3.3 Materiales y métodos

Todos los procedimientos de recolecta en campo (2.1) y procesamiento de extracción de ADN, preparación de librería de la técnica ddRad-seq y secuenciación de nueva generación (fragmentos ddRad-tag) (2.2) se describieron en el capítulo 2. Así mismo, en ese capítulo se describe el procesamiento de los datos en lo que respecta al ensamblaje y alineamiento de las secuencias de ddRad-tag (2.3).

#### 3.3.1 Análisis de datos

Las propiedades genéticas básicas de cada población y los grupos genéticos se evaluaron y describieron utilizando estadísticos clásicos de genética de poblaciones. Para el caso de los SNPs obtenidos con la técnica ddRadseq fueron heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) y coeficientes de endogamia ( $F_{is}$ ), los cuales fueron generados con STACKS (Catchen et al., 2013; Rochette et al., 2019). Debido a que el estudio está dirigido a determinar niveles de variación a nivel intralocalidades, los resultados de estos parámetros se presentan en el **Anexo 2**.

### 3.3.1.1 Estructura genética y filogeográfica

Se realizaron estimaciones de  $\phi_{st}$  y  $F_{st}$  por pares de sitios con STACKS (Catchen et al., 2011), utilizando el módulo "*populations*" con el indicador "--fstats". Para determinar el efecto de las barreras putativas sobre el patrón filogeográfico de cada especie se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el estadístico  $\Phi_{ST}$  y evaluando varios niveles de agrupamiento de acuerdo con las localidades ubicadas a cada lado de las barreras. Se definieron dos barreras para las especies de fondos rocosos (*A. rivasi*, *C. pica* y *N. tessellata*): 1. ausencia del hábitat específico por más de 300 km de línea costera entre las localidades de La Guajira (Cabo de La Vela/Punta Gallinas) y el sector de Santa Marta; y 2. la pluma del río Magdalena. Para el caso de las especies de fondos blandos (*M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri*) fueron: 1. Estrechamiento de la plataforma continental debido a la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM); y 2. La pluma del río Magdalena. Un tercer análisis se realizó para las especies que presentaron subestructuración de acuerdo con los resultados del análisis bayesiano de STRUCTURE (sólo para *C. pica*, *A. rivasi*, *M. melongena* y *S. proops*). Los AMOVA se realizaron con la función *poppr.amova* del paquete *poppr* (Kamvar et al., 2014) en R.

Como complemento a lo anterior, se determinó la estructura genética espacial de cada especie para identificar el número probable de poblaciones (K) utilizando el enfoque bayesiano con el programa STRUCTURE v.2.3.3 (Hubisz et al., 2009). Cada ejecución incluyó 200000 iteraciones de burnin, seguidas de 800000 iteraciones MCMC utilizadas para calcular un K probable entre una y n+1 poblaciones en cada caso, con siete ejecuciones para cada valor de K simulado. Aquí se asumieron los modelos de mezcla (Admixture Model) y de alelos correlacionados (Allele Frequencies Correlated). El número de poblaciones más probables se determinó con los métodos propuestos por Evanno et al. (2005), Raj et al. (2014) y Puechmaille (2016), usando el programa STRUCTURE SELECTOR (Li and Liu, 2018), que incluye el programa CLUMPAK (Kopelman et al., 2015), el cual fue utilizado para combinar y visualizar los resultados de STRUCTURE. Los individuos dentro de las poblaciones se ordenaron de acuerdo con las localidades de muestreo. También se realizó para cada especie un análisis de componentes principales (PCA) ejecutado con la función *dudi.pca* del paquete *ade4* (Dray y Dufour, 2007) en R.

El análisis del patrón filogeográfico se realizó a partir de los análisis filogenéticos basados en secuencias de consenso que consistieron en concatenar 367676 SNPs para *C. pica*, 477072 SNPs para *A. rivasi*, 229422 SNPs para *N. tessellata*; 115040 SNPs para *M. melongena*, 38291 SNP para *S. proops* y 1083 SNPs para *M. furnieri*. Los archivos fueron generados mediante el programa de población STACKS con la función *--phylip\_var*. Las matrices generadas se utilizaron para realizar los análisis de máxima verosimilitud (ML) con el programa IQTREE 1.3.10 (Nguyen et al., 2015), con dos corridas independientes, incluida la selección de modelos con corrección de sesgo de verificación SNP, 1 000 réplicas de arranque ultrarrápidas y 10 000 iteraciones. El modelo de evolución de secuencias con base en SNP fue seleccionado por IQTREE

siguiendo una selección de modelo BIC (Criterio de Información Bayesiano), siendo TVMe+ASC+G4 para *C. pica*, TVM+ASC+G4 para *A. rivasi*, TVMe+ASC+G4 para *N. tessellata*, TVMe+ASC+G4 para *M. melongena*, K2P+ASC+R2 para *S. proops* y TNe+ASC para *M. furnieri*. Como complemento se hicieron árboles Network con el método de agrupamiento NeighborNet en el programa SplitsTree v4 (Huson y Bryant, 2006).

### 3.3.1.2 Modelo genético poblacional

Para determinar el modelo poblacional de cada especie (abierta, aislada, jerárquica de poblaciones), se realizó la prueba de Mantel para correlacionar las matrices de distancias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) y geográficas (km) utilizando la función *mantel* del paquete de R *vegan* 2.5.7 (Oksanen et al., 2020). Se determinaron las distancias geográficas lineales y de borde costero con Google Earth, cuyas coordenadas se presentan en la **Tabla 1-1**. Se desarrollaron dos análisis: 1. con los datos sin ningún tipo de manipulación previa (Diniz et al. (2013) y 2. Siguiendo la propuesta de Rousset (1997), donde los valores de  $\Phi_{ST}$  por pares fueron linealizados ( $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ) y las distancias geográficas fueron transformadas a logaritmo. También se realizó un análisis de correlograma de Mantel, en el que las distancias geográficas se dividieron en submatrices en marca de clases (Diniz-Filho et al., 2013). Esto se hizo con el objetivo de descartar falsos positivos del análisis de aislamiento por distancia cuando las poblaciones están subestructura significativamente a causa de la presencia de barreras biogeográficas (Meirmans, 2012).

### 3.3.1.3 Concordancia filogeográfica entre especies

El análisis de concordancia filogeográfica se realizó comparando la topología de los dendrogramas que fueron construidos con los valores de  $\Phi_{ST}$  calculados entre pares de localidades. Se utilizó el método propuesto por Kendall et al. (2018), el cual consiste en comparar la topología de los árboles de acuerdo con los nombres de las categorías de las puntas. En este caso la medida de concordancia se calcula tomando en cuenta un árbol de referencia R (sp1) cuyas puntas son un conjunto de categorías (sin repeticiones) y un árbol comparable T (sp2) cuyas puntas son individuos de esas categorías (o sin repeticiones). La medida cuenta la proporción de pares de puntas cuyo ancestro común más cercano (MRCA) en el árbol T aparece en el mismo lugar que MRCA de sus categorías en el árbol R (Kendall et al., 2018). La medida puede suministrar valores entre 0 y 1. Es 1 cuando la concordancia es completa, de manera que la versión colapsada del árbol T es idéntica a la de R. Para esta medida, las comparaciones se hicieron entre los dendrogramas de las especies de fondos rocosos someros: *A. rivasi* y *C. pica*, *A. rivasi* Vs. *N. tessellata* y *C. pica* Vs. *N. tessellata*, cada comparación se hizo con cinco nombres de categorías representando las cinco localidades que coincidieron en los muestreos. Para el caso de las especies de fondos someros blandos el número de localidades varió de cinco a seis: *M. melongena* Vs. *S. proops* (6 localidades), *M. melongena* Vs. *M.*

*furnieri* (5 localidades) y *S. proops* Vs. *M. furnieri* (5 localidades). El procedimiento se realizó con la función *treeConcordance* del paquete de R *treeSpace* (Jombart et al., 2017), ingresando la matriz en el formato Newick de cada dendrograma.

Otro estimador utilizado para determinar la congruencia topológica y genética fue el test de congruencia entre matrices de distancias (CADM; Campbell et al., 2011), el cual evalúa la hipótesis de *completa incongruencia entre los árboles de las especies*, que corresponde a filogenias con topologías diferentes y/o longitudes de las ramas muy diferentes (*sensu* Campbell et al., 2011). Si la hipótesis nula se falsea, se aceptará la hipótesis: *por lo menos dos árboles del grupo de especies son parcial o completamente congruentes*. El nivel de congruencia se determinó con el estadístico *W* de Kendall, el cual presenta valores entre 0 y 1, siendo 0 no congruencia y 1 completa congruencia topológica o genética de los árboles. Para el test de congruencia topológica se utilizaron las matrices de distancias pareadas entre los pares de puntas de cada dendrograma, utilizando como referencia las longitudes de sus ramas. Estas matrices se obtuvieron para cada especie a partir de los árboles construidos con los valores de  $\Phi_{ST}$  calculados entre pares de localidades. Para esto se ejecutó la función *cophenetic.phylo* del paquete de R *Ape* (Paradis et al., 2004), utilizando la matriz en el formato Newick resultante de cada dendrograma. Con respecto al test de congruencia genética, se utilizaron las matrices de  $\Phi_{ST}$  calculados entre pares de localidades. Finalmente, el test de CADM se ejecutó para cada tipo de congruencia y entre pares de especies dentro de cada tipo de ecosistema, con la función *CADM.global* del paquete de R *Ape* (Paradis et al., 2004). El valor de significancia fue estimado a partir de 99 999 permutaciones.

Como complemento se realizaron análisis de autocorrelación espacial (test de Mantel) entre las matrices triangulares de los valores  $\Phi_{ST}$  pareados de las especies codistribuidas en los mismos sitios muestreados. Así que las especies de fondos rocosos fueron evaluadas entre ellas y las de los fondos blandos por aparte. Estos análisis se hicieron con la función *mantel* del paquete de R *vegan* 2.5.7 (Oksanen et al., 2020). Valores de *r* tendientes a 1 y con  $p < 0,05$  indican congruencia entre las matrices. El valor de significancia fue estimado a partir de 99 999 permutaciones.

### 3.4 Resultados

Se obtuvieron 10.122.277 lecturas de 85 individuos de *Acanthemblemaria rivasi*, 8.764.529 lecturas para 65 individuos de *Cittarium pica*, 3.385.649 para 51 individuos de *Nerita tessellata*, 10.490.744 para 63 individuos de *Melongena melongena*, 5.902.040 para 65 muestras de *Sciades proops* y 58.628 lecturas para 75 individuos de *Micropogonias furnieri*. De las 95 muestras iniciales de *A. rivasi* solo 85 muestras cumplieron los requisitos de calidad; mientras que de las 95 muestras iniciales de *C. pica*, sólo 65 individuos cumplieron los requisitos. En el caso de *N. tessellata* fueron 51 de 95, mientras que para el caso de *M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri* fueron 63, 65 y 75 de 95 individuos procesados para cada respectiva especie. La razón para descartarlas fue

porque las muestras presentaron un bajo número de lecturas sin procesar y no logrando ser recuperadas ( $\leq 250.000$ ) o porque el número de loci faltantes superó 35%. En **Anexo 2** se presenta el número de muestras distribuido por localidad.

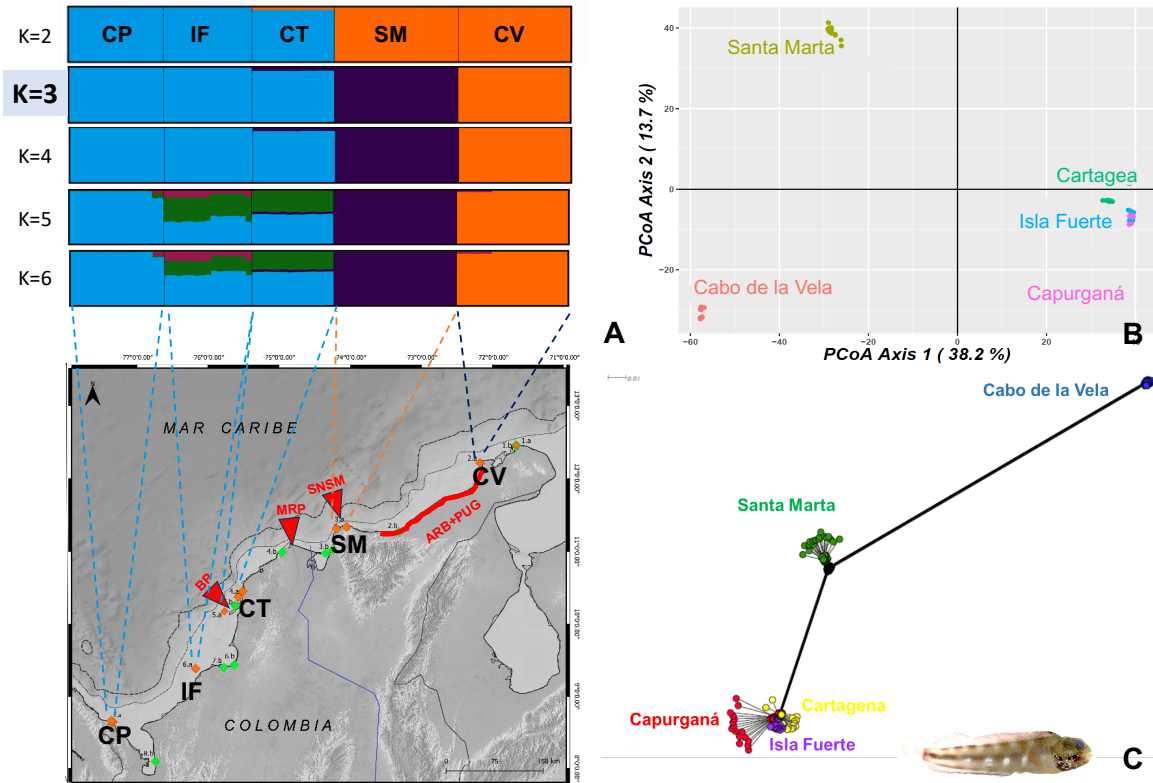
El número promedio de loci SNP polimórficos utilizables por muestra varió: 66.325 se determinaron para *A. rivasi*, 55.151 para *C. pica*, 21.333 para *N. tessellata*, 41.907 para *M. melongena*, 15.158 para *S. proops* y sólo 215 loci para *M. furnieri*. Las estadísticas resumidas que incluyen el número de SNP retenidos, heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la endogamia ( $F_{is}$ ) se presentan en el **Anexo 2**.

### 3.4.1 Estructura filogeográfica

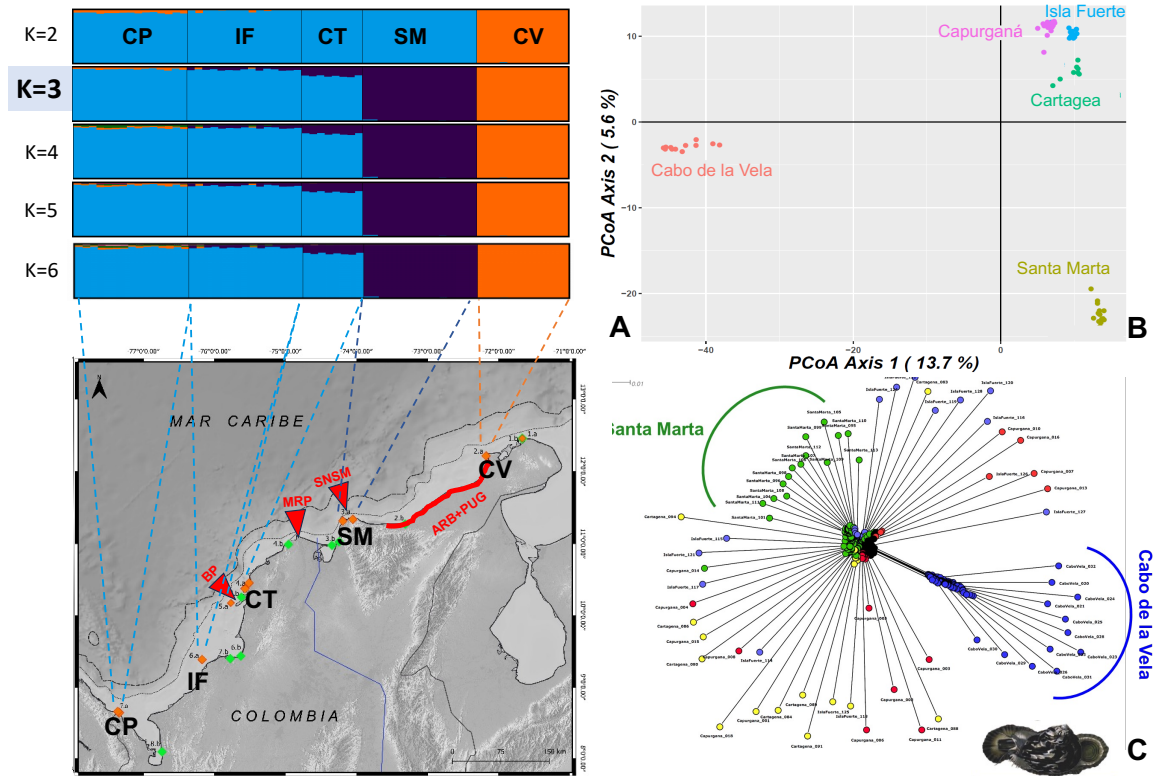
El análisis de diferenciación genética entre pares de localidades permitió observar en las especies de fondo rocoso un patrón variable en los niveles de diferenciación. *Acanthemblemaria rivasi* tuvo una muy gran diferenciación genética entre las muestras del Cabo de la Vela y las otras localidades (valores de  $\Phi_{ST} > 0,290$ ;  $p < 0,05$ ), siendo de mayor magnitud con la más alejada (Capurganá;  $\Phi_{ST} = 0,345$ ;  $p < 0,05$ ). Las muestras de Santa Marta también mostraron una gran diferenciación genética en comparación con el resto de las localidades ( $\Phi_{ST} > 0,262$ ;  $p < 0,05$ ); mientras que las recolectadas en Cartagena, Isla Fuerte y Capurganá tuvieron una moderada diferenciación entre ellas ( $\Phi_{ST} < 0,097$ ; **Tabla 3-1**). Los resultados del análisis bayesiano suministraron resultados variables entre los estimativos del número probable de poblaciones. Por ejemplo, el estimativo de  $\Delta K$  suministró un  $K=2$ . Según el gráfico de barra, la primera población está distribuida en el Cabo de la Vela y la segunda en Santa Marta, Cartagena, Isla Fuerte y Capurganá (**Figure 3-1**). Los de MedMedK y MedMeanK indicaron un  $K=3$ , fijándose la primera en el Cabo de la Vela nuevamente, la segunda en Santa Marta y la tercera entre Cartagena, Isla Fuerte y Capurganá. Para el caso de los estimativos de  $\ln P(K)$ , MaxMedK y MaxMeanK, el  $K$  fue 5, manteniéndose las tres primeras poblaciones como en  $K=3$ , pero siendo la cuarta (de mayor proporción) y quinta poblaciones (en una mínima proporción) codistribuidas principalmente en Cartagena e Isla Fuerte. El análisis de componentes principales (PCA) y el árbol Network mostraron tres clústeres, los cuales son congruentes con el  $K=3$  del análisis bayesiano y los niveles de diferenciación basados en  $\Phi_{ST}$  (**Figura 3-1**).

Para el caso de *C. pica*, se observó nuevamente a las muestras del Cabo de la Vela diferenciadas del resto de las localidades. Aunque esta diferenciación genética fue moderada ( $\Phi_{ST} > 0,160$ ;  $p < 0,05$ ), el mayor valor lo presentó con su localidad vecina de Santa Marta ( $\Phi_{ST} = 0,160$ ;  $p < 0,05$ ). Nuevamente, las localidades de Cartagena, Isla Fuerte y Capurganá presentaron menor nivel de diferenciación entre sus muestras, en este caso fue pequeña ( $\Phi_{ST} < 0,013$ ;  $p < 0,05$ ; **Tabla 3-1**). Con respecto al análisis bayesiano, los estimativos de  $\ln P(K)$ , MedMedK, MedMeanK, MaxMedK y MaxMeanK calcularon un  $K=3$ , con una población en el Cabo de la Vela, la segunda en Santa Marta, con una mínima proporción en Cartagena (<5%); y la tercera codistribuida entre Cartagena, Isla

Fuerte y Capurganá. El  $\Delta K$  estimó un  $K=5$ , igual que en  $K=3$ , pero con la cuarta y quinta en mínimas proporciones (<3%) y codistribuidas entre Isla Fuerte y Capurganá. El PCA y el árbol Network presentaron tres y dos clústeres, respectivamente. El PCA es congruente con la propuesta de  $K=3$  y con los resultados de  $\Phi_S$ ; mientras que el árbol Network lo fue con el  $K=2$  (Figura 3-2).

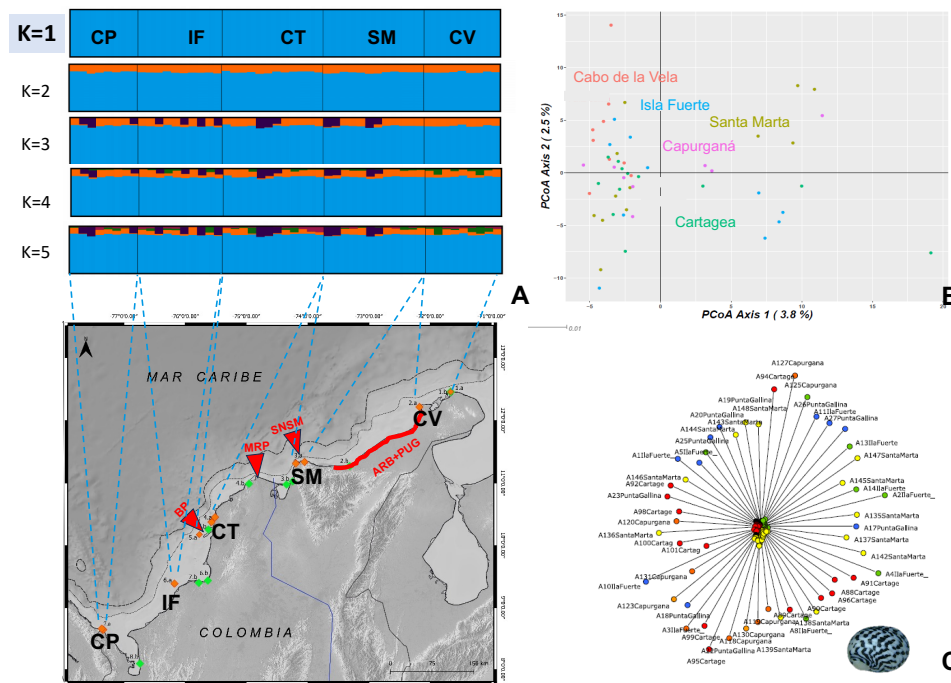


**Figura 3-1.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Acanthemblemaria rivasi* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (Tabla 3-5). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú).



**Figura 3-2.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Cittarium pica* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (Tabla 3-5). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú).

En lo que respecta a *N. tessellata*, presentó una pequeña diferenciación genética entre todas las localidades, con un valor promedio de  $\Phi_{ST}=0,006$ , siendo los más altos, pero de pequeña diferenciación, los de Cabo de la Vela con el resto de localidades ( $\Phi_{ST}<0,009$ ; **Tabla 3-1**). Por su parte, los estimativos de MedMedK, MedMeanK, MaxMedK y MaxMeanK calcularon un K =1 codistribuida en todas las localidades. Para el caso de  $\Delta K$  y LnP(K) proponen un K igual a 3 y 2, respectivamente. Las dos primeras codistribuidas desde el Cabo de la Vela hasta Capurganá, siendo una con mayor proporción que la otra. La tercera población propuesta por LnP(K) también está codistribuida en una mínima proporción en todas las localidades, excepto en el Cabo de la Vela. El PCA y el árbol Network concuerdan con la propuesta de K=1 (**Figure 3-3**).



**Figura 3-3.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Nerita tessellata* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (Tabla 3-5). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú).

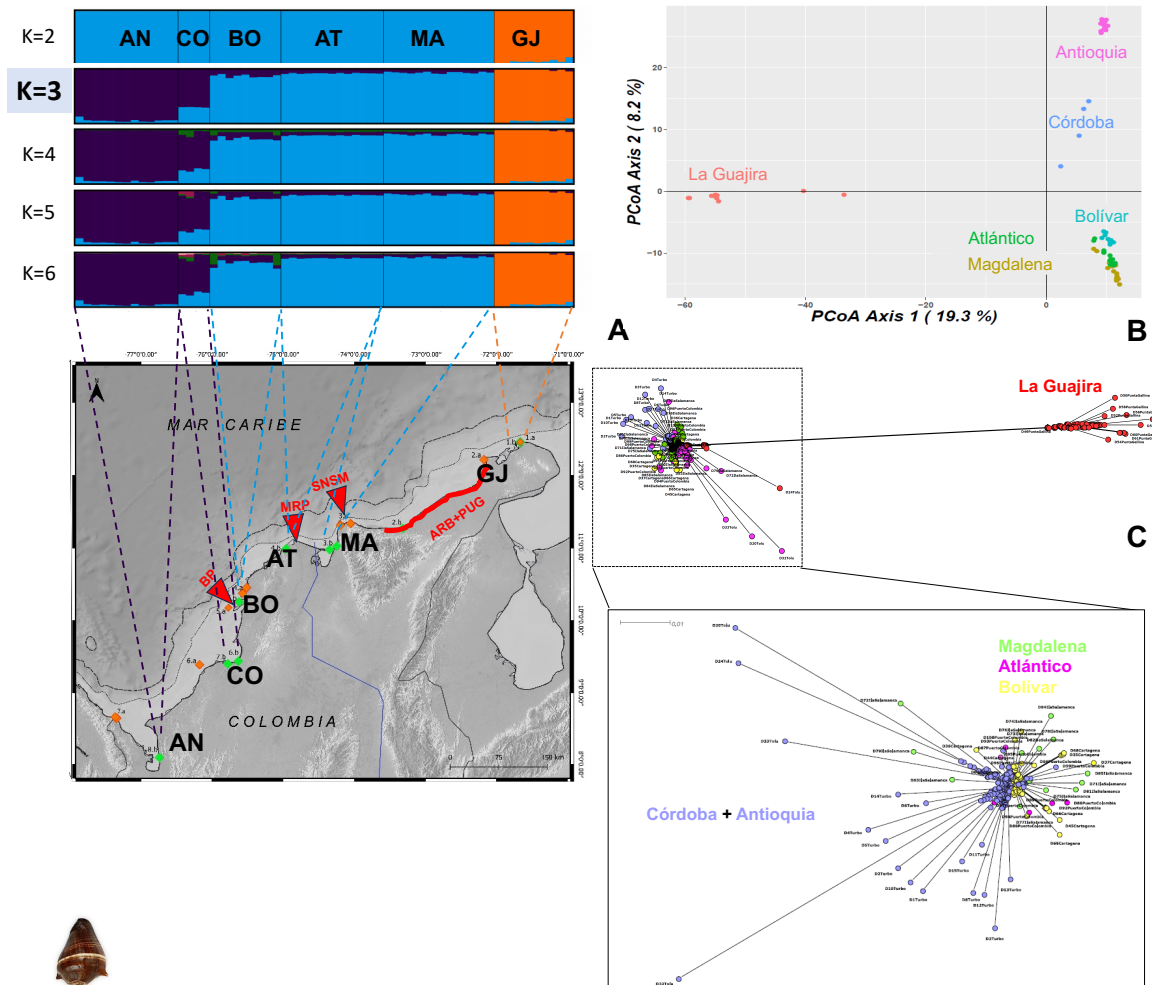
**Tabla 3-1.** Valores pareados de  $\Phi_{ST}$  entre las cinco localidades muestreadas en el Caribe de Colombia para las especies *A. rivasi*, *C. pica*, *N. tessellata*. Todos los valores presentaron nivel de significancia  $p < 0,005$ , excepto los indicados con asterisco.

<i>Acanthemblemaria rivasi</i>				
	Santa Marta	Cartagena	Isla Fuerte	Capurganá
Cabo de la Vela	0,290	0,318	0,336	0,345
Santa Marta		0,246	0,262	0,257
Cartagena			0,069	0,080
Isla Fuerte				0,097
<i>Cittarium pica</i>				
	Santa Marta	Cartagena	Isla Fuerte	Capurganá
Cabo de la Vela	0,175	0,160	0,136	0,130
Santa Marta		0,057	0,060	0,063
Cartagena			0,008	0,013
Isla Fuerte				0,007
<i>Nerita tessellata</i>				
	Santa Marta	Cartagena	Isla Fuerte	Capurganá
Cabo de la Vela	0,008	0,008	0,009	0,009
Santa Marta		0,005	0,006	0,003
Cartagena			0,005	0,004
Isla Fuerte				0,005



Las especies de fondos blandos presentaron un patrón de diferenciación genética similar a las de fondos rocosos. En el caso de *M. melongena*, también se observa que la localidad de La Guajira es la más diferente genéticamente con relación a las demás localidades, principalmente con Córdoba ( $\Phi_{ST}=0,248$ ;  $p<0,05$ ) (**Tabla 3-2**). Las muestras de Magdalena tuvieron pequeña diferenciación con las de Atlántico ( $\Phi_{ST}=0,010$ ;  $p<0,05$ ) y Bolívar ( $\Phi_{ST}=0,028$ ;  $p<0,05$ ); mientras que con las otras localidades fue moderada (Córdoba y Antioquia;  $\Phi_S<0,096$ ;  $p<0,05$ ). Por su parte, Atlántico presentó pequeña diferenciación con Bolívar ( $\Phi_S=0,022$ ;  $p<0,05$ ); estas dos presentaron moderada diferenciación con las muestras recolectadas en Córdoba y Antioquia ( $\Phi_{ST}>0,054$ ;  $p<0,05$ ); y estas últimas presentaron una pequeña diferenciación entre ellas ( $\Phi_{ST} =0,022$ ;  $p<0,05$ ) (**Tabla 3-2**). En lo referente al análisis bayesiano, *M. melongena* presentó un  $K=2$  según el  $\Delta K$ , con una primera población distribuida en La Guajira y la segunda codistribuida desde el Magdalena hasta Antioquia. Los estimativos de MedMedK, MedMeanK y MaxMedK calcularon un  $K=3$ , fijando la primera población en La Guajira, la segunda codistribuida entre Magdalena, Atlántico y Bolívar y la tercera entre Córdoba y Antioquia. LnP(K) y MaxMeanK proponen un  $K=4$ , con una distribución similar a la de  $K=3$ , pero estando la cuarta población codistribuida en mínima proporción entre Magdalena y Córdoba (color verde). El PCA y el árbol Network presentaron 3 y 2 clústeres, respectivamente, congruentes con  $K$  igual 3 y 2, respectivamente (**Figura 3-4**).

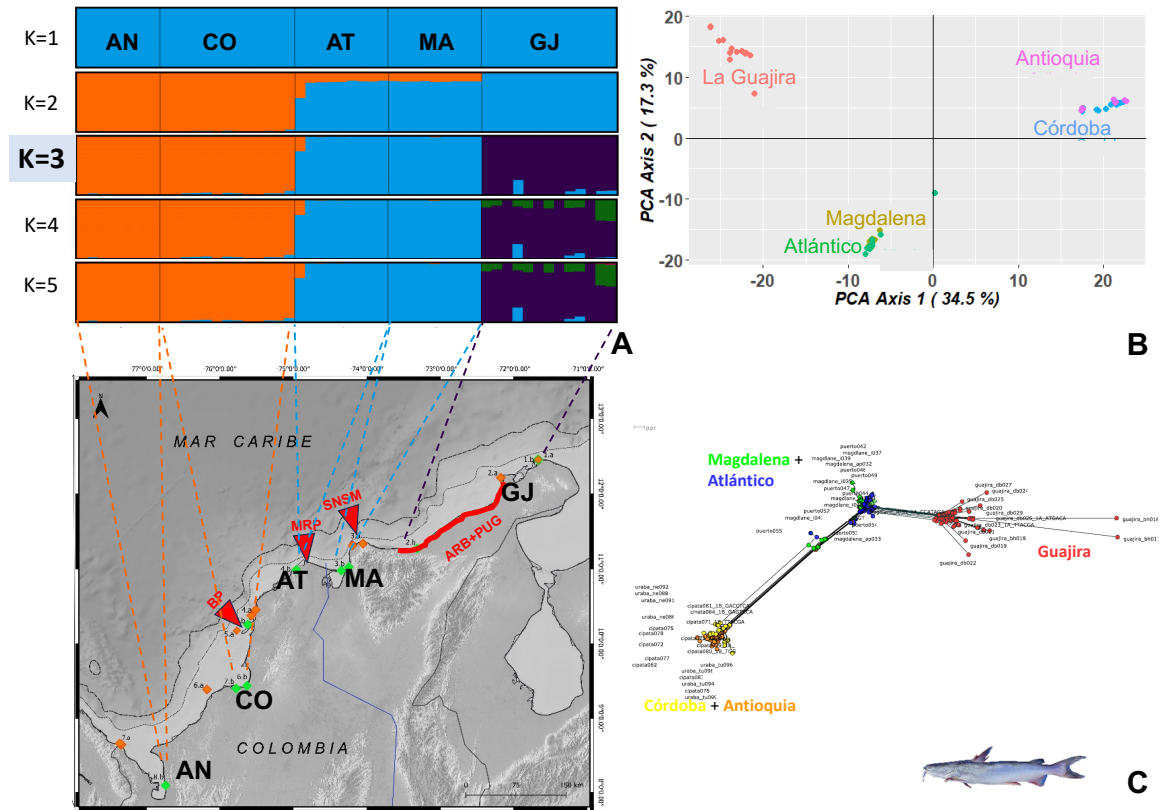
*Sciades proops* mostró que las muestras de La Guajira presentaron de grande a muy grande diferenciación genética con el resto de localidades ( $\Phi_{ST}>0,220$ ;  $p<0,05$ ), siendo muy grande con las de Córdoba ( $\Phi_{ST}=0,310$ ;  $p<0,05$ ). Con las de Magdalena ocurrió lo mismo. Fue muy diferente con Córdoba y Antioquia ( $\Phi_{ST}>0,297$ ;  $p<0,05$ ), pero con las de Atlántico se presentó una pequeña diferenciación genética ( $\Phi_{ST}=0,006$ ;  $p<0,05$ ). Las diferencias genéticas de las muestras de Atlántico con las de Córdoba y Antioquia también fueron muy grandes ( $\Phi_{ST}=0,288$ ;  $p<0,05$ ); y estas dos presentaron una pequeña diferenciación ( $\Phi_{ST}>0,016$ ;  $p<0,05$ ) (**Tabla 3-2**). El análisis bayesiano indicó por  $\Delta K$  un  $K=2$ , con la primera población ubicada en La Guajira y la segunda desde Magdalena hasta Antioquia. Los estimativos de MedMedK, MedMeanK, MaxMedK y MaxMeanK calcularon un  $K=3$ , manteniendo la primera en La Guajira, la segunda codistribuida entre Magdalena y Atlántico; y la tercera entre Córdoba y Antioquia. LnP(K) presentó un  $K=4$ , con una distribución similar a la propuesta de  $K=3$ , pero con una cuarta población ubicada en La Guajira. El PCA y el árbol Network determinaron tres clústeres con distribución de las localidades similar a  $K=3$  (**Figure 3-5**).



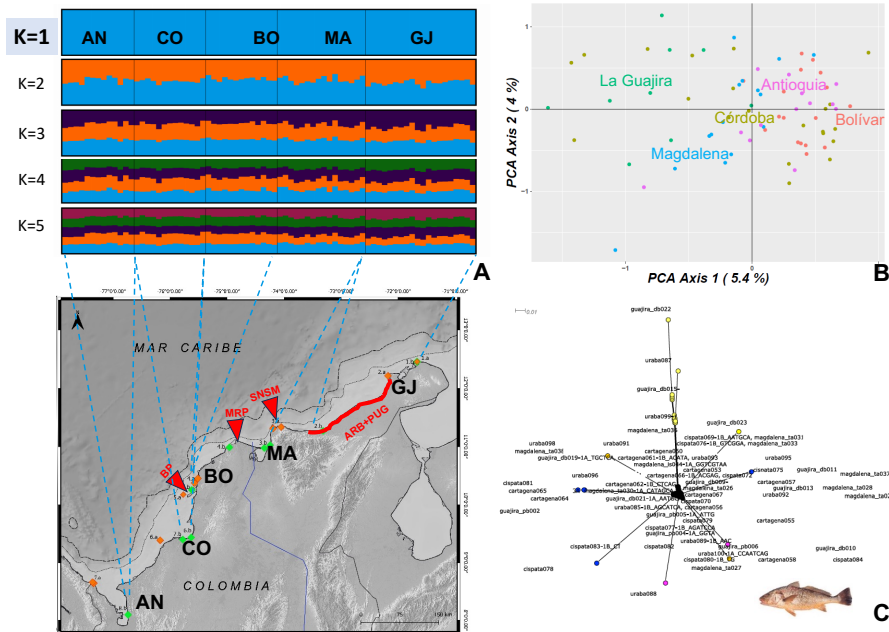
**Figura 3-4.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Melongena melongena* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (**Tabla 3-5**). los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú).

Con relación a *M. furnieri*, no se observó un patrón espacial en los niveles de diferenciación genética determinados entre pares de localidades. Los valores de  $\Phi_{ST}$  entre localidades indicaron pequeña diferenciación genética, a excepción de las comparaciones de La Guajira y Magdalena con Antioquia, las cuales presentaron valores negativos, con  $\Phi_{ST}=-0,006$  ( $p>0,05$ ) y  $\Phi_{ST}=-0,004$  ( $p>0,05$ ), respectivamente (**Tabla 3-2**). El análisis de Structure mostró por medio de  $\ln P(K)$  un  $K=1$ , donde esa única población está codistribuida entre La Guajira y Antioquia. Los estimativos de MedMedK, MedMeanK, MaxMedK y MaxMeanK calcularon un  $K=2$  y  $\Delta K$  en  $K=3$ . Esas dos

poblaciones adicionales están codistribuidas en todas las localidades. El PCA y el árbol filogenético Network presentaron un solo clúster, ajustado al K=1 (Figure 3-6).



**Figura 3-5.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Sciades proops* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (Tabla 3-5). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú).



**Figura 3-6.** Gráfico de barra del coeficiente de ancestría de población del análisis de Structure indicando la distribución del número de K poblaciones probables (A), análisis de componentes principales (B) y árbol filogenético network construido con el método NeighborNet (C) entre las muestras de las cinco localidades analizadas para *Micropogonias furnieri* en el Caribe de Colombia. El valor resaltado de K indica el consenso de todos los análisis realizados (Tabla 3-5). Los triángulos y línea roja señalan las barreras putativas (ARB+PUG: combinación del efecto de la ausencia del fondo rocoso somero y la surgencia casi permanente en la península de La Guajira; SNSM: estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta; MRP: pluma del río Magdalena; BP: fondos coralinos de la península de Barú)

**Tabla 3-2.** Valores pareados de  $\Phi_{ST}$  entre localidades muestreadas en el Caribe de Colombia para las especies *M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri*. Todos los valores presentaron nivel de significancia  $p < 0,005$ , excepto los indicados con asterisco.

<i>Melongena melongena</i>					
	Magdalena	Atlántico	Bolívar	Córdoba	Antioquia
Guajira	0,216	0,214	0,230	0,248	0,230
Magdalena		0,010	0,028	0,060	0,096
Atlántico			0,022	0,054	0,090
Bolívar				0,056	0,089
Córdoba					0,021
<i>Sciades proops</i>					
	Magdalena	Atlántico	Córdoba	Antioquia	
Guajira	0,220	0,218	0,310	0,299	
Magdalena		0,006	0,297	0,298	
Atlántico			0,288	0,288	
Córdoba				0,016	
<i>Micropogonias furnieri</i>					
	Magdalena	Bolívar	Córdoba	Antioquia	
Guajira	0,004	0,024	0,009	-0,006*	
Magdalena		0,010	0,005	-0,004*	
Bolívar			0,018	0,014	
Córdoba				0,004	

### 3.4.2 Identificación de quiebres filogeográficos

El análisis de diferenciación genética por medio del AMOVA presentó un nivel de estructuración poblacional y filogeográfico en todas las especies analizadas ( $\Phi_{ST} > 0,076$ ,  $p < 0,05$ ), excepto en *N. tessellata* ( $\Phi_{ST} = 0,001-0,002$ ,  $p > 0,05$ ) y *M. furnieri* ( $\Phi_{ST} = 0,027-0,028$ ,  $p > 0,05$ ) que no presentaron subestructuración (**Tabla 3-3**) y sin evidencias de quiebres filogeográficos (**Figure 3-3**, **Figure 3-6**, **Figure 3-7C**, **Figure 3-8C**). Para *A. rivasi*, una de las especies de fondos rocosos, la causa principal del patrón filogeográfico fue la combinación de dos barreras putativas: 1. ausencia del fondo y litoral rocoso y el afloramiento entre el Cabo de la Vela y Santa Marta ( $\Phi_{CT} = 0,406$ ,  $p < 0,05$ ) y 2. La pluma del río Magdalena ( $\Phi_{CT} = 0,420$ ,  $p < 0,05$ ). Estas dos barreras delimitan las tres poblaciones que fueron identificadas para *A. rivasi*. Bajo este escenario, un tercer análisis se realizó asumiendo el número de población más probable ( $K=3$ ), determinándose una elevada diferenciación genética ( $\Phi_{CT} = 0,495$ ,  $p < 0,05$ ) (**Tabla 3-3**). El análisis filogenético realizado con el método de NeighborNet y máxima verosimilitud (ML) fue concordante con el AMOVA de *A. rivasi* cuando se asumió el  $K=3$ , confirmando el efecto combinado de las dos barreras putativas (**Figura 3-1**; **Figura 3-7A**). En ambos árboles se observan tres clados con un soporte del 100% de bootstrap. Igual como en el análisis bayesiano cuando  $K=3$ : un clado está conformado por las muestras del Cabo de la Vela, el segundo por las de Santa Marta (100% de bootstrap) y el tercero por Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá (100%).

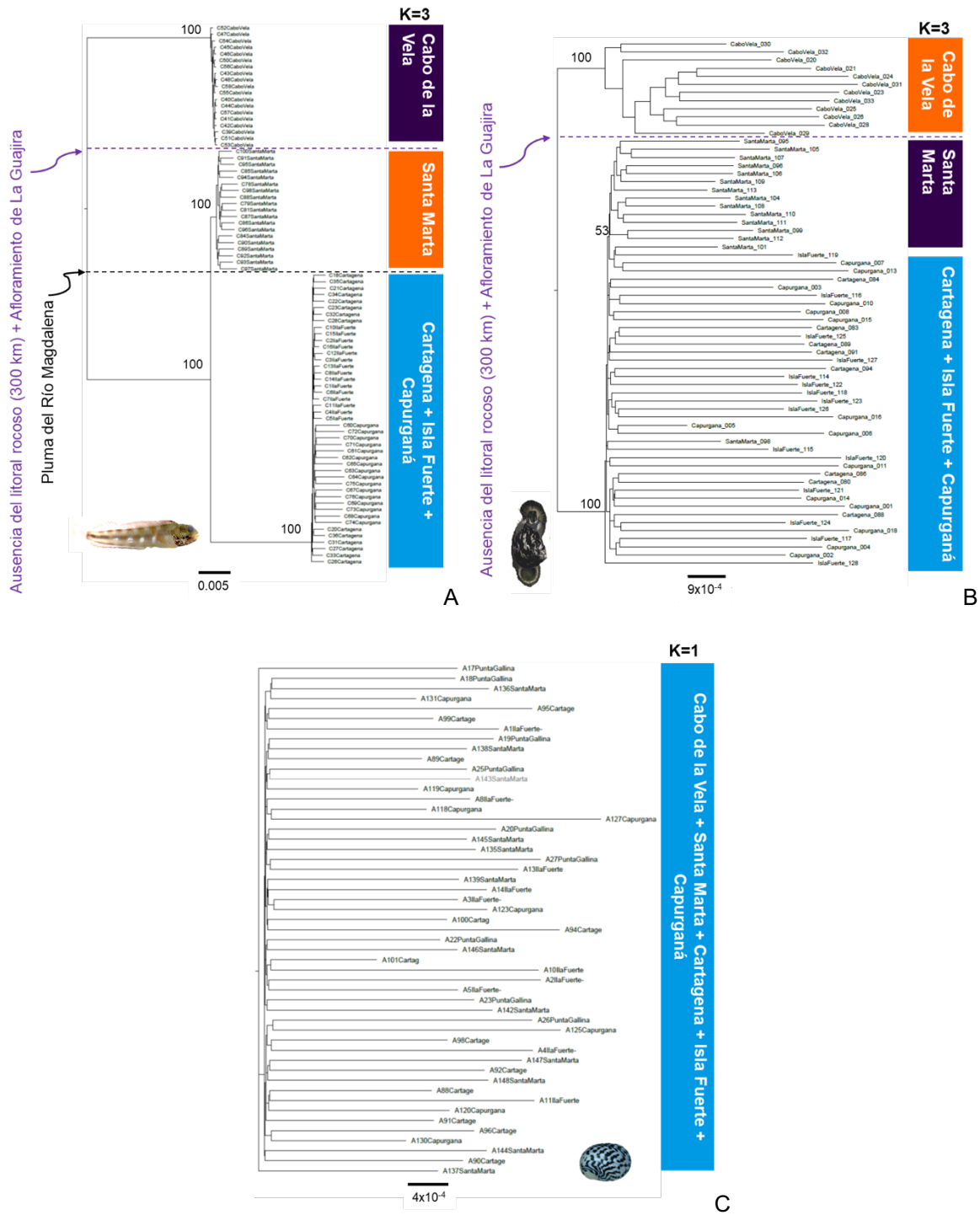
En lo referente a *C. pica*, otra de las especies de fondo rocosos, cuando se asumió como barrera la ausencia del hábitat específico+afloramiento entre el Cabo de la Vela y Santa Marta se observó una muy gran diferenciación genética entre las muestras de ambos lados ( $\Phi_{CT} = 0,224$ ,  $p < 0,05$ ), en comparación con el escenario de la pluma del río Magdalena, la cual fue moderada la diferenciación ( $\Phi_{CT} = 0,076$ ,  $p < 0,05$ ). Cuando se realizó el análisis asumiendo  $K=3$ , la diferenciación fue grande ( $\Phi_{CT} = 0,174$ ,  $p < 0,05$ ) (**Tabla 3-3**). Sin embargo, el análisis filogenético fue concordante con el escenario de la ausencia del hábitat específico+afloramiento entre el Cabo de la Vela y Santa Marta (100% de bootstrap). Sólo se configuran dos clados, uno a cada lado de la barrera (clado 1. Cabo de la Vela y clado 2. Santa Marta+Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá). A pesar de lo anterior, en el clado 2 del árbol ML se observa cómo las muestras de Santa Marta están más relacionadas entre sí, pero separadas del resto de localidades y conformando un subclado dentro de éste, pero con un soporte de 53% (**Figure 3-7B**). En el árbol NeighborNet las muestras de Santa Marta también reflejan una relación genética mayor con las tres localidades del suroccidente del Caribe que con las del Cabo de la Vela (**Figura 3-2**).

Con respecto a las especies de los fondos blandos, la barrera que más influyó en el patrón filogeográfico fue la ausencia de la plataforma continental debida a la SNSM, causando una ruptura al flujo genético en *M. melongena* ( $\Phi_{CT} = 0,317$ ,  $p < 0,05$ ) y *S. proops*

( $\Phi_{CT}=0,375$ ,  $p<0,05$ ). Bajo el escenario de la pluma del río Magdalena como barrera, el efecto fue moderado genéticamente en *M. melongena* ( $\Phi_{CT}=0,080$ ,  $p<0,05$ ) y muy grande en *S. proops* ( $\Phi_{CT}=0,275$ ,  $p<0,05$ ) (**Tabla 3-3**). Cuando se asumió el  $K=3$ , *M. melongena* presentó un nivel de diferenciación grande ( $\Phi_{CT}=0,237$ ,  $p<0,05$ ); mientras que el de *S. proops* fue muy grande ( $\Phi_{CT}=0,472$ ,  $p<0,05$ ). Para ambas especies, el análisis filogenético con los árboles de ML y Network fue concordante con el escenario en el que se asume como barrera el estrechamiento de la plataforma continental debido a SNSM (**Figure 3-4, Figure 3-5, Figure 3-8A, B**). Para *M. melongena* y *S. proops*, el primer clado lo conforman las muestras de La Guajira (ambos con soporte del 100% de bootstrap en el árbol ML); el segundo las de Magdalena + Atlántico + Bolívar + Córdoba + Antioquia en el caso de *M. melongena* (100% de bootstrap); y para *S. proops* son las de Magdalena+Atlántico, dado que se determinó un segundo quiebre filogeográfico, al configurarse un tercer clado con las muestras de Córdoba y Antioquia (100% de bootstrap; **Figura 3-8B**).

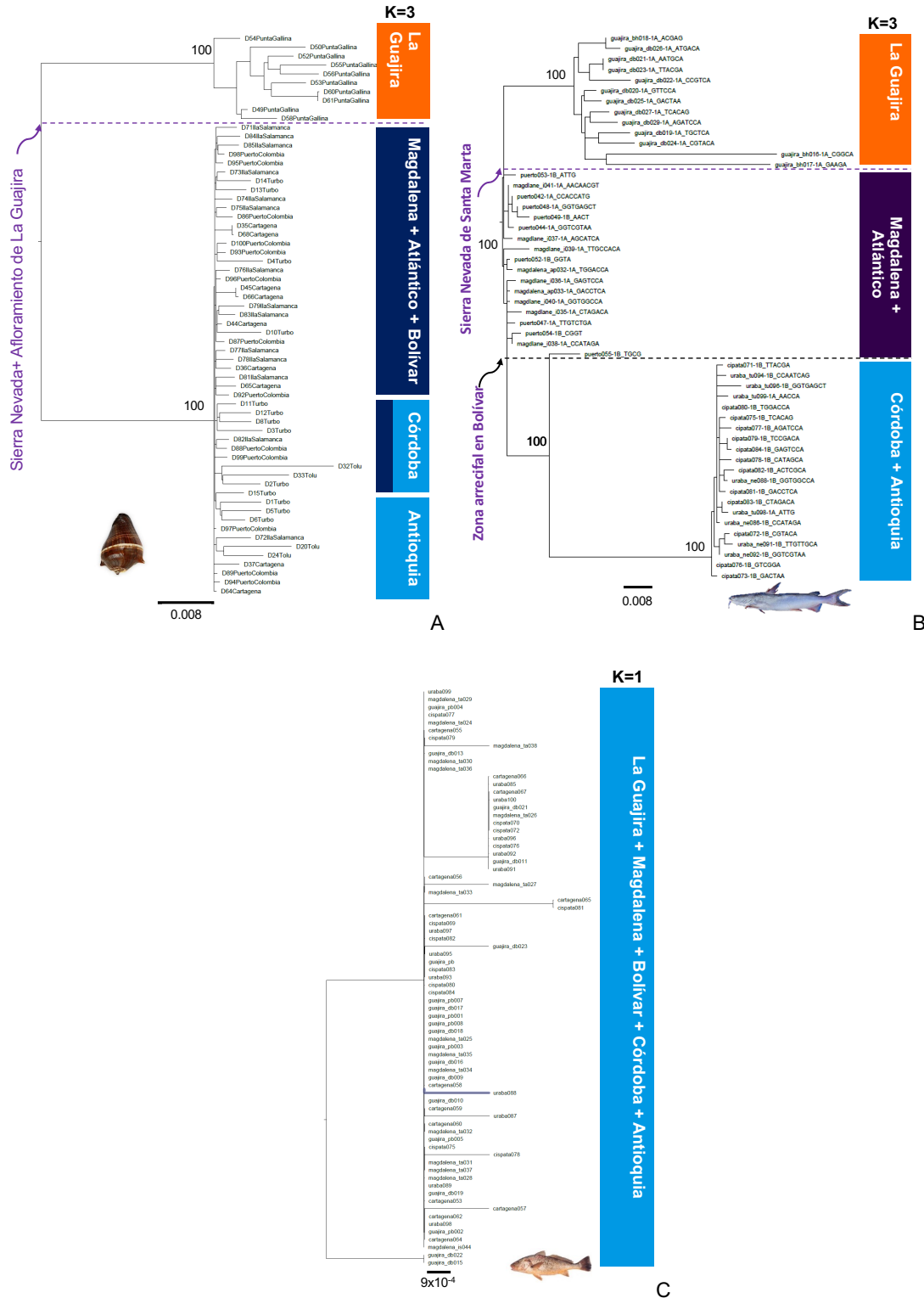
**Tabla 3-3.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) evaluando los efectos de las tres barreras putativas sobre las especies *Acanthemblemaria rivasi*, *Cittarium pica*, *Nerita tessellata*, *Melongena melongena*, *Sciades proops* y *Micropogonias furnieri*. Los valores del estadístico evaluaron el nivel de diferenciación entre los grupos ( $\phi_{CT}$ ), dentro de las localidades de cada grupo ( $\phi_{SC}$ ) y entre todas las localidades ( $\phi_{ST}$ ); se indica el porcentaje de variación de cada fuente de comparación; \* nivel de significancia  $p > 0,05$ .

Especie	Tipo de fondo	Historia larval	Estadísticos F para cada nivel de comparación		
			$\phi_{ST}$	$\phi_{SC}$	$\phi_{CT}$
<b>Efecto de la pluma del río Magdalena como barrera</b>					
<i>A. rivasi</i>	Rocoso	Larva pelágica (22-25 días)	0,551 44,9%	0,226 13,1%	0,420 42,0%
<i>C. pica</i>	Rocoso	Larva pelágica (2-6 días)	0,223 77,7%	0,159 14,7%	0,076 7,6%
<i>N. tessellata</i>	Rocoso	Larva pelágica (90-150 días)	0,129 87,1%	0,128 12,8	0,001* 0,1%
<i>M. melongena</i>	Blando	Sin larva pelágica	0,194 80,6%	0,124 11,4%	0,080 8,0%
<i>S. proops</i>	Blando	Sin larva pelágica	0,439 56,1%	0,226 16,4%	0,275 27,5%
<i>M. furnieri</i>	Blando	Larva pelágica (30-50 días)	0,021 97,8%	-0,005* -0,5%	0,028* 2,7%
<b>Efecto de la Sierra Nevada de Santa Marta como barrera</b>					
<i>M. melongena</i>	Blando	Sin larva pelágica	0,353 64,7%	0,053 3,6%	<b>0,317</b> 31,7%
<i>S. proops</i>	Blando	Sin larva pelágica	0,500 50,0%	0,200 12,5%	<b>0,375</b> 35,5%
<i>M. furnieri</i>	Blando	Larva pelágica (30-50 días)	0,022 97,8%	-0,005* -0,5%	0,027* 2,7%
<b>Efecto de la ausencia del fondo/litoral rocoso somero-afloramiento en La Guajira como barrera</b>					
<i>A. rivasi</i>	Rocoso	Sin larva pelágica	0,582 41,8%	0,297 17,6%	0,406 40,6%
<i>C. pica</i>	Rocoso	Larva pelágica (<6 días)	0,318 68,2%	0,12 9,3%	<b>0,224</b> 22,4%
<i>N. tessellata</i>	Rocoso	Larva pelágica (90-150 días)	0,132 86,8%	0,127 12,7%	0,005 0,5%
<b>Basado en el K más probable</b>					
<i>A. rivasi</i> (K=3)	Rocoso	Larva pelágica (22-25 días)	0,541 45,9%	0,090 4,6%	<b>0,495</b> 49,5%
<i>C. pica</i> (K=3)	Rocoso	Larva pelágica (2-6 días)	0,251 74,9%	0,093 7,7%	0,174 17,4%
<i>M. Melongena</i>	K=3	Blando	Sin larva pelágica 75,8	0,007* 0,5%	0,237 23,7%
	K=4	Blando	Sin larva pelágica 76,6%	0,002 0,2%	0,234 23,4%
<i>S. proops</i> (K=3)	Blando	Sin larva pelágica	0,451 54,9%	-0,039* -2,1%	<b>0,472</b> 47,2%



**Figura 3-7.** Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud con la matriz de SNPs y la representación de los resultados del análisis de STRUCTURE indicando el número de K más probable y relacionando localidades del Caribe de Colombia para *A. rivasi* (A), *C. pica* (B) y *N. tessellata* (C). Las líneas punteadas indican las barreras putativas.





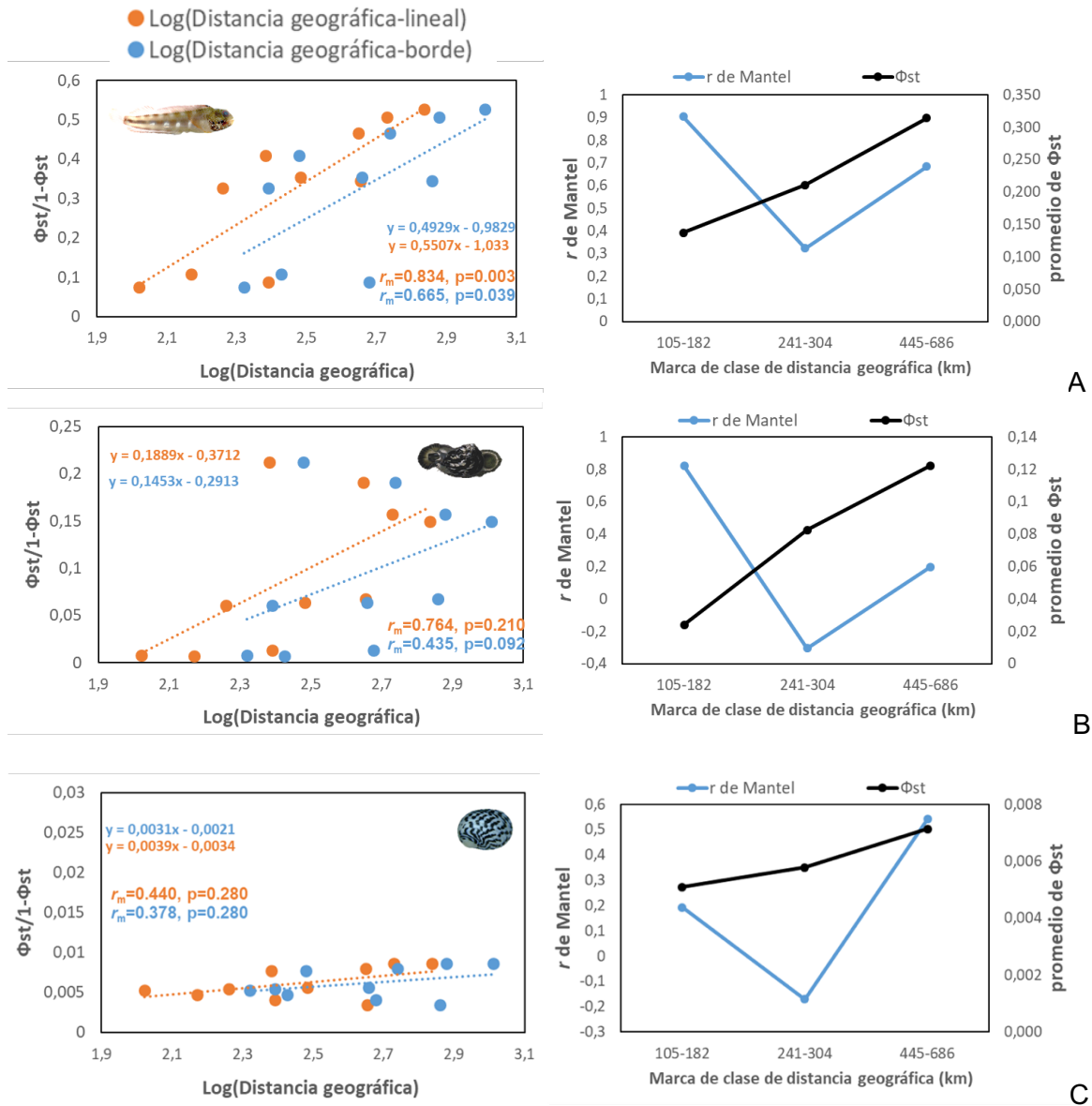
**Figura 3-8.** Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud con la matriz de SNPs y la representación de los resultados del análisis de STRUCTURE indicando el número de K más probable y relacionando localidades del Caribe de Colombia para *M. melongena* (A), *S. proops* (B) y *M. furnieri*. Las líneas punteadas indican las barreras putativas.

### 3.4.3 Modelo poblacional genético

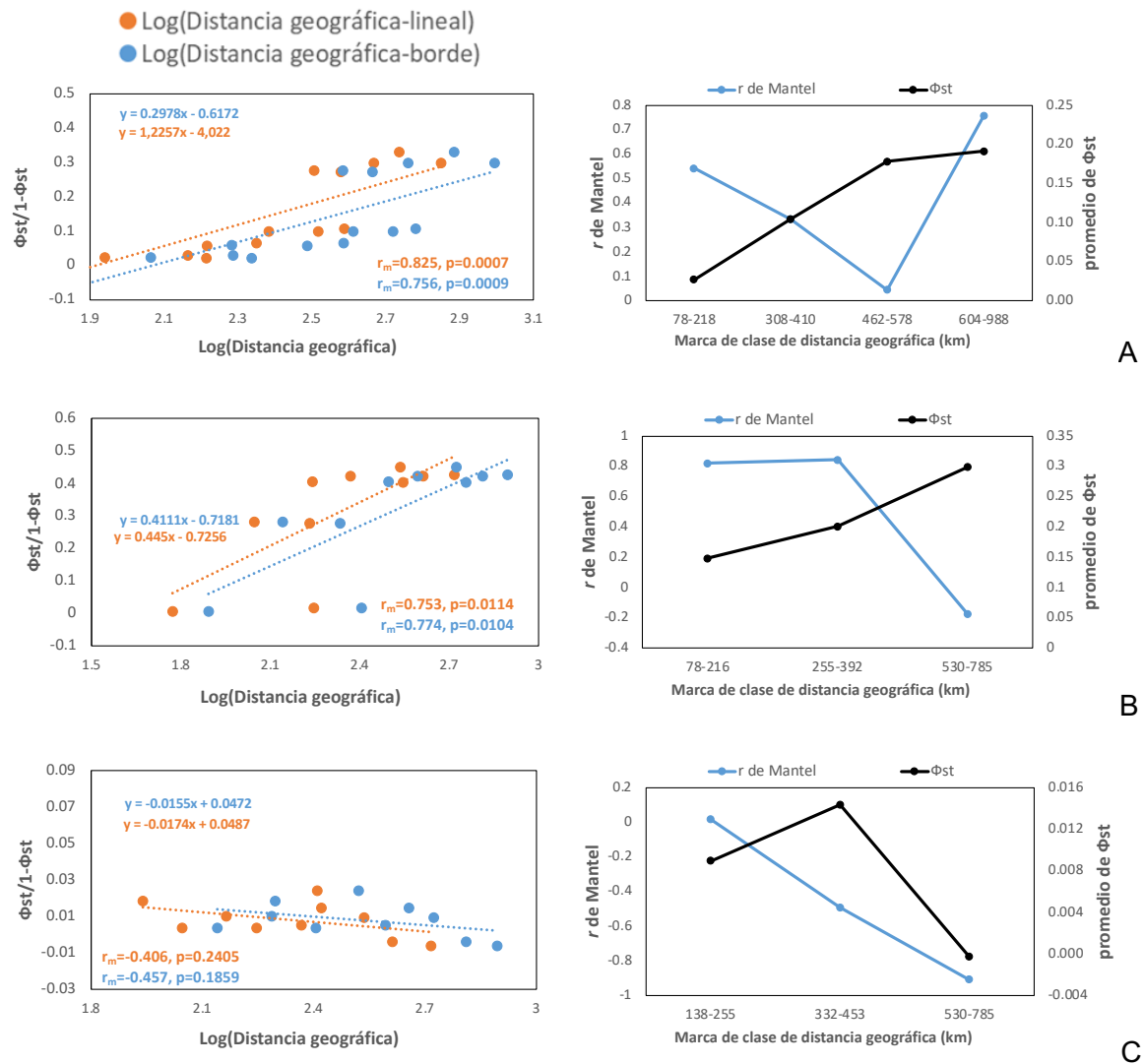
El análisis de la prueba de Mantel realizado entre las distancias geográficas lineales/borde y las genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) reveló para *A. rivasi* una autocorrelación significativa con los dos métodos (sin transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,623$ ,  $p=0,0253$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,774$ ,  $p=0,0118$ ; con transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,665$ ,  $p=0,039$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,834$ ,  $p=0,003$ ; **Figure 3-9A; Tabla 3-4**). Desde el punto de vista geográfico, las muestras del Cabo de la Vela presentaron los mayores valores de distancias genéticas y geográficas (por ejemplo, con las de Capurganá:  $Dg=686 \text{ km}/\Phi_{ST}=0,345$ ). Los menores valores se observaron entre las localidades vecinas, como Cartagena-Isla Fuerte, Isla Fuerte-Capurganá. Aunque la prueba de Mantel sugiere que *A. rivasi* se ajusta al modelo poblacional de aislamiento por distancia (IBD en inglés), el correlograma indicó que realmente se ajusta al modelo jerárquico de poblaciones.

*Cittarium pica* presentó coeficientes de correlación altos y medios, pero no significativos (sin transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,441$ ,  $p=0,2059$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,616$ ,  $p=0,0571$ ; con transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,435$ ,  $p=0,092$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,764$ ,  $p=0,210$ ; **Figure 3-9B; Tabla 3-4**). Por lo tanto, no se ajustó al modelo de aislamiento por distancia. En contraste, el análisis de correlograma indicó que *C. pica* se ajusta al modelo de estructura jerárquica de poblaciones. Con relación a *N. tessellata*, los coeficientes de correlación estuvieron por debajo de 0,580 y no fueron significativos (sin transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,422$ ,  $p=0,2265$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,580$ ,  $p=0,0831$ ; con transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,378$ ,  $p=0,280$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,440$ ,  $p=0,280$ ; **Figure 3-9C; Tabla 3-4**). La tendencia a cero de la pendiente (a) en las funciones lineales del análisis y los valores muy bajos de  $\Phi_{ST}$  sugieren que *N. tessellata* se ajusta al modelo de poblaciones abiertas.

Para el caso de las especies de fondos blandos, *M. melongena* (sin transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,793$ ,  $p=0,0003$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,871$ ,  $p=0,0001$ ; con transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,756$ ,  $p=0,0009$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,825$ ,  $p=0,0007$ ) y *S. proops* (sin transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,676$ ,  $p=0,0265$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,643$ ,  $p=0,0451$ ; con transformación:  $r_{m \text{ borde}}=0,753$ ,  $p=0,0114$ ;  $r_{m \text{ lineal}}=0,774$ ,  $p=0,0104$ ) presentaron coeficientes de correlación altos y significativos (**Figure 3-10A,B; Tabla 3-4**). Estos resultados sugieren para ambas especies se ajustan al modelo poblacional IBD, pero los resultados del correlograma proponen el modelo de estructura jerárquica de poblaciones. Finalmente, en lo concerniente a *M. furnieri* la tendencia a cero de la pendiente (a) en las funciones lineales del análisis y los valores muy bajos de  $\Phi_{ST}$  sugiere ajustarse al modelo de población abierta (**Figure 3-10C**).



**Figura 3-9.** Gráficos de la prueba de Mantel entre las distancias geográficas transformadas a logaritmo (lineales y de borde costero) y las distancias genéticas linealizadas [ $\Phi_{ST}/(1 - \Phi_{ST})$ ] (izquierda); gráfico de correlograma de los coeficientes de correlación y los promedios de  $\Phi_{ST}$  estimados en cada marca de clase de distancia geográfica lineal (derecha). A. *rivasi* (A), *C. pica* (B) y *N. tessellata* (C).  $r_m$ =coeficiente de correlación de la prueba de Mantel; p de significancia corregido después de 9999 permutaciones.



**Figura 3-10.** Gráficos de la prueba de Mantel entre las distancias geográficas transformadas a logaritmo (lineales y de borde costero) y las distancias genéticas linealizadas [ $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ] (izquierda); Gráfico de correlograma de los coeficientes de correlación parciales y los promedios de  $\Phi_{ST}$  estimados en cada marca de distancia geográfica del borde (derecha). *M. melongena* (A), *S. proops* (B) y *M. furnieri* (C).  $r_m$ =coeficiente de correlación de la prueba de Mantel;  $p$  de significancia corregido después de 9999 permutaciones.

**Tabla 3-4.** Resultados de las pruebas de Mantel con las distancias geográficas (lineales y de borde costero) y genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) y con las distancias geográficas transformadas a logaritmo correlacionadas con la distancia genética linealizada [ $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ]; resultados del correlograma de Mantel y decisión del tipo de modelo poblacional.  $r_m$ =coeficiente de correlación de la prueba de Mantel; Dg=distancia geográfica;  $\Phi_{ST}$ =índice de fijación; IBD= aislamiento por distancia; P de significancia corregido después de 9999 permutaciones.

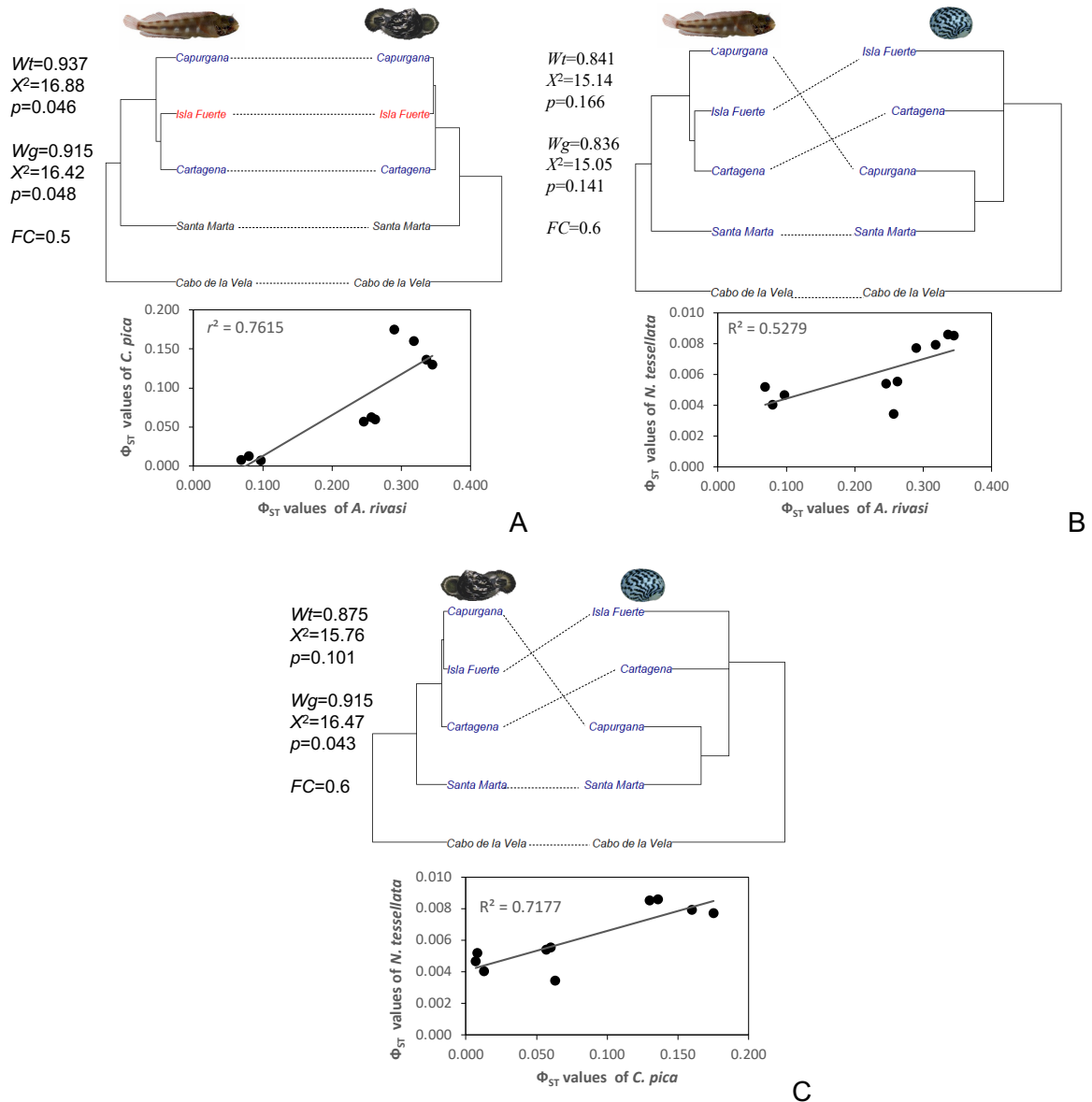
Especie	Sin transformación		Con transformación a logaritmo y linealizada $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$		Correlograma de Mantel			IBD	Modelo poblacional
	$r_m$ Dg borde	$r_m$ Dg lineal	$r_m$ Dg borde	$r_m$ Dg lineal	Marcas de clase de Dg	$r_m$	$\Phi_{ST}$ promedio		
<i>A. rivasi</i>	0,623 p=0,0253	0,774 p=0,0118	0,665 p=0,039	0,834 p=0,003	105-182	0,903	0,137	No	Jerárquico de poblaciones
					241-304	0,323	0,211		
					445-686	0,684	0,314		
<i>C. pica</i>	0,441 p=0,2059	0,616 p=0,0571	0,435 p=0,092	0,764 p=0,210	105-182	0,821	0,024	No	Jerárquico de poblaciones
					241-304	-0,304	0,083		
					445-686	0,197	0,122		
<i>N. tessellata</i>	0,422 p=0,2265	0,580 p=0,0831	0,378 p=0,280	0,440 p=0,280	105-182	0,192	0,005	No	Abierta
					241-304	-0,171	0,006		
					445-686	0,541	0,007		
<i>M. melongena</i>	0,793 p=0,0003	0,871 p=0,0001	0,756 p=0,0009	0,825 p=0,0007	78-218	0,542	0,027	No	Jerárquico de poblaciones
					308-410	0,334	0,105		
					462-578	0,045	0,178		
					604-988	0,758	0,191		
<i>S. proops</i>	0,676 p=0,0265	0,643 p=0,0451	0,753 p=0,0114	0,774 p=0,0104	78-216	0,821	0,148	No	Jerárquico de poblaciones
					255-392	0,844	0,201		
					530-785	-0,175	0,299		
<i>M. furnieri</i>	-,0,546 p=0,1021	-,0,550 p=0,0941	-,0,406 p=0,2405	-,0,457 p=0,1859	138-255	0,017	0,009	No	Abierta
					332-453	-0,493	0,014		
					530-785	-0,908	0,000		

**Tabla 3-5.** Resumen de los análisis para determinar estructura filogeográfica de *A. rivasi*, *C. pica*, *N. tessellata*, *M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri* en el Caribe sur.

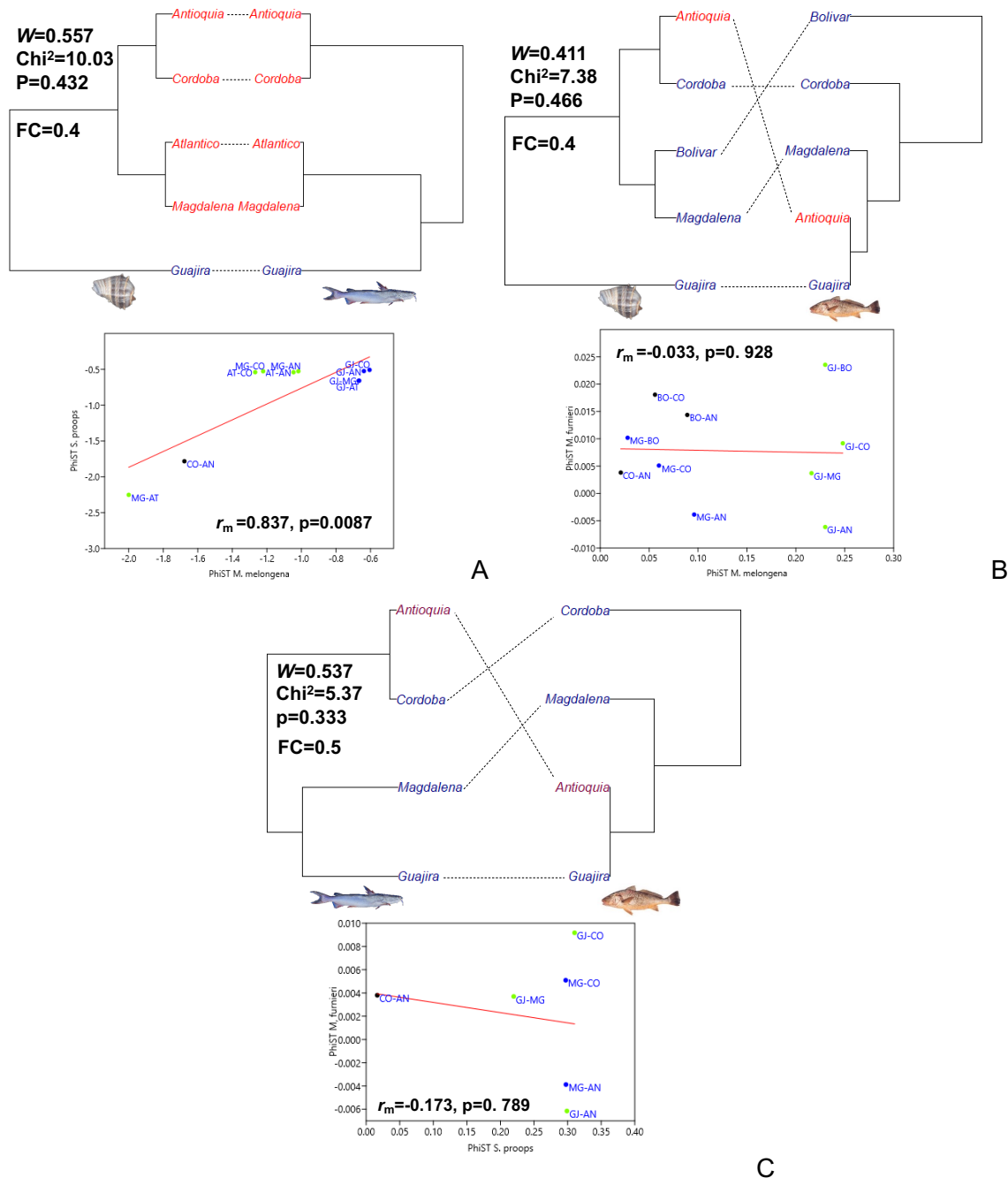
Tipo de análisis		Fondos rocosos someros			Fondos blandos someros		
		<i>A. rivasi</i>	<i>C. pica</i>	<i>N. tessellata</i>	<i>M. melongena</i>	<i>S. proops</i>	<i>M. furnieri</i>
STRUCTURE	ΔK	2	5	3	2	2	3
	LnP(K)	5	3	2	4	4	1
	MedMedK	3	3	1	3	3	2
	MedMeanK	3	3	1	3	3	2
	MaxMedK	5	3	1	3	3	2
	MaxMeanK	5	3	1	4	3	2
PCA		3	3	1	3	3	1
Número de clústeres por ML/Network		3/3	2/2	1/1	2/2	3/3	1/1
Φ <sub>ST</sub> global		0,230	0,081	0,006	0,111	0,225	0,008
K más probable		3	3	1	3	3	1
Quiebres filogeográficos		2	1	0	1	2	0

### 3.4.4 Concordancia filogeográfica entre especies

La comparación de los dendrogramas según la similitud de los sitios muestreados ubicados en la topología determinó una relativa concordancia entre *A. rivasi* y *N. tessellata* y entre *C. pica* y *N. tessellata*, con un factor de 0,6 para ambas comparaciones; mientras que la de *A. rivasi* y *C. pica* fue de 0,5. Las pruebas globales de congruencia topológica y genética indicaron alta y significativa congruencia entre las tres especies. No obstante, en las comparaciones por pareja, fue *A. rivasi* y *C. pica* la que presentó una significativa congruencia topológica ( $W=0,937$ ,  $\text{Chi}^2=16,88$ ,  $p=0,046$ ) y genética ( $W=0,915$ ,  $\text{Chi}^2=16,42$ ,  $p=0,048$ ), y correlación entre sus distancias genéticas ( $r_m=0,958$ ,  $p=0,001$ ). Sólo en la congruencia genética la comparación entre *A. rivasi* y *N. tessellata* fue significativa ( $W=0,915$ ,  $\text{Chi}^2=16,47$ ,  $p=0,043$ ; **Figure 3-11; Tabla 3-6**). Con relación a las especies de fondo blandos, las concordancias de la ubicación de los sitios en la topología de los dendrogramas fueron bajas entre todas las comparaciones, con factores de 0,4 en las comparaciones de *M. melongena* con las otras dos especies y de 0,5 entre *S. proops* y *M. furnieri* (**Figure 3-12; Tabla 3-6**). En cuanto a las pruebas globales de congruencia topológica ( $W=0,314$ ,  $\text{Chi}^2= 4,71$ ,  $p=0,499$ ) y genética ( $W=0,517$ ,  $\text{Chi}^2= 7,76$ ,  $p=0,129$ ) entre las especies no fueron significativas. A pesar de lo anterior, la comparación entre *M. melongena* y *S. proops* presentaron únicamente una significativa congruencia genética ( $W=0,836$ ,  $\text{Chi}^2=15,05$ ,  $p=0,008$ ) y correlación entre las distancias genéticas ( $r_m=0,837$ ,  $p=0,009$ ; **Figure 3-12; Tabla 3-6**).



**Figura 3-11.** Dendrogramas de los valores de  $\Phi_{ST}$  construidos con el método UPGMA para *A. rivasi*, *C. pica* y *N. tessellata*, y análisis de autocorrelación espacial entre las matrices de  $\Phi_{ST}$  transformadas a logaritmo, relacionando las localidades en el ámbito geográfico del Caribe sur, sector Colombia. A. análisis entre *A. rivasi* y *C. pica*; B. entre *A. rivasi* y *N. tessellata*; C. entre *C. pica* y *N. tessellata*. FC= factor de concordancia topológica; W=estadístico de Kendall de la congruencia topológica;  $r_m$ =coeficiente de correlación de Mantel; p=nivel de significancia. Los colores de los nombres de los sitios: **negro**, **azul** y **rojo** indican alta, media y baja concordancia en sus ubicaciones en los dendrogramas.



**Figura 3-12.** Dendrogramas de los valores de  $\Phi_{ST}$  construidos con el método UPGMA para *M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri*, y análisis de autocorrelación espacial entre las matrices de  $\Phi_{ST}$  transformadas a logaritmo, relacionando las localidades en el ámbito geográfico del Caribe sur, sector Colombia. A. análisis entre *S. proops* y *M. melongena*; B. entre *M. melongena* y *M. furnieri*; C. entre *S. proops* y *M. furnieri*. FC= factor de concordancia topológica; W=estadístico de Kendall de la congruencia topológica;  $r_m$ =coeficiente de correlación de Mantel;  $p$ =nivel de significancia. Los colores de los nombres de los sitios: **negro**, **azul** y **rojo** indican alta, media y baja concordancia en sus ubicaciones en los dendrogramas.



**Tabla 3-6.** Análisis de factor de concordancia, y congruencia topológica y genética entre pares de especies codistribuidas en los ecosistemas de fondos rocosos someros y fondos blandos someros del Caribe sur, sector Colombia.  $W$ =estadístico de Kendall;  $r_m$ =coeficiente de correlación de Mantel;  $p$ =nivel de significancia.

Pares de especies	Factor de concordancia	Congruencia topológica		Congruencia genética		Prueba de Mantel
		Global	Entre pares de especies	Global	Entre pares de especies	
<b>Fondos rocosos someros</b>						
<i>A. rivasi</i> Vs. <i>C. pica</i>	0,5		<b><math>W=0,937</math></b> Chi <sup>2</sup> =16,88 p=0,046		<b><math>W=0,915</math></b> Chi <sup>2</sup> =16,42 p=0,048	<b><math>r_m =0,958</math></b> p=0,001
<i>A. rivasi</i> Vs. <i>N. tessellata</i>	0,6	<b><math>W=0,847</math></b> Chi <sup>2</sup> =22,86 p=0,012	W=0,841 Chi <sup>2</sup> =15,14 P=0,166	<b><math>W=0,852</math></b> Chi <sup>2</sup> =23,00 p=0,011	<b><math>W=0,915</math></b> Chi <sup>2</sup> =16,47 p=0,043	$r_m =0,611$ p=0,063
<i>C. pica</i> Vs. <i>N. tessellata</i>	0,6		W=0,875 Chi <sup>2</sup> =15,76 p=0,101		W=0,836 Chi <sup>2</sup> =15,05 p=0,141	$r_m =0,549$ p=0,097
<b>Fondos blandos someros</b>						
<i>M. melongena</i> Vs. <i>S. proops</i>	0,4		W=0,557 Chi <sup>2</sup> =10,03 p=0,432		<b><math>W=0,836</math></b> Chi <sup>2</sup> =15,05 p=0,008	<b><math>r_m =0,837</math></b> p=0,009
<i>M. melongena</i> Vs. <i>M. furnieri</i>	0,2	W=0,314 Chi <sup>2</sup> = 4,71 p=0,499	W=0,411 Chi <sup>2</sup> =7,38 p=0,466	W=0,517 Chi <sup>2</sup> = 7,76 p=0,129	W=0,433 Chi <sup>2</sup> =7,79 p=0,529	$r_m =-0,033$ p=0,928
<i>S. proops</i> Vs. <i>M. furnieri</i>	0,5		W=0,537 Chi <sup>2</sup> =5,37 p=0,333		W=0,514 Chi <sup>2</sup> =5,14 p=0,459	$r_m =-0,173$ p=0,789

### 3.5 Discusión

Se evaluó la filogeografía comparada de seis especies marinas con alto (*N. tessellata*, *M. furnieri*) y bajo (*A. rivasi*, *C. pica*, *M. melongena*, *S. proops*) potencial de dispersión larval ante la presencia de barreras putativas en el Caribe sur. Por primera vez se utilizó la técnica ddRad-seq para analizar de cientos a miles de SNPs de las seis especies, como estrategia para tener mayor resolución de sus genomas y evaluar el efecto de las barreras biogeográficas sobre la filogeografía de las especies. La literatura sustenta la relevancia que tienen los SNPs para determinar los niveles de subestructuración genética y la filogeografía de las especies (McCormack et al., 2013; Reitzel et al., 2013; Leaché y Oaks, 2017). Incluso, sobre marcadores tradicionales como los loci microsatélites (Liu et al., 2005; Fischer et al., 2017; Zimmerman et al., 2020), aunque

tienen mayor importancia en la cuantificación de la variabilidad genética. En este estudio se logró un número significativo de SNPs para todas las especies, excepto en *M. furnieri*, a la que se lograron retener 215 SNPs (de 15.158 SNPs para *S. proops* a 66.325 SNPs para *A. rivasi*). Estas cantidades están dentro de los estudios realizados con otras especies marinas (Boehm et al., 2015; Grewe et al., 2015).

### 3.5.1 Estructura filogeográfica

#### 3.5.1.1 Especies de alto potencial de dispersión

Los análisis de subestructuración genética ( $\Phi_{ST}$  pareados, bayesiano, PCA, AMOVA y árboles filogenéticos ML/network) permitieron determinar el número de poblaciones más probable para las seis especies marinas muestreadas en el Caribe Sur, que incluye a Colombia. Coincidió que las dos especies de alto potencial de dispersión larval presentaron una población ( $K=1$ ). Fue el caso de *N. tessellata* y *M. furnieri*, que presentan larvas con un periodo de duración de más de 90 (Underwood, 1975; Waters et al., 2005; Reisser et al., 2013) y 30 días (Fabiano et al., 2016), respectivamente. Los valores globales de  $\Phi_{ST}$  fueron bajos para ambas especies y coinciden con los determinados para otras especies marinas asociadas a la ecorregión del Caribe Sur, que fueron estimados con diversos marcadores moleculares (genes mitocondriales y loci microsatélites), principalmente en peces (*Stegastes partitus*, Ospina et al., 2008; *Lutjanus synagris*, Landínez-García et al., 2009; *Caranx hippos*, Caiafa et al., 2018), erizo (*Echinometra lucunter lucunter*, Benavides, 2020), camarón (*Litopenaeus schmitti*, Valle et al., 2015) y tiburón (*Rhizoprionodon porosus*, Almanza et al., 2014). Aunque en algunos casos fueron significativos, los niveles de diferenciación genética entre las localidades fueron muy bajos para identificar algún tipo de quiebre filogeográfico ( $F_{ST} < 0,05$ ) y están correlacionados con el alto potencial de dispersión de las especies estudiadas (PLD > 10 días; Ospina et al., 2008; Landínez-García et al., 2009; Valle et al., 2015; Caiafa et al., 2018; Benavides, 2020). Otros estudios en el que ampliaron la cobertura del muestreo a otras regiones del gran Caribe documentaron que especies con un PLD alto no presentan patrón filogeográfico (*Echinolittorina ziczac* y *Cenchritis muricatus*, Díaz-Ferguson et al., 2012; *Panulirus argus*, Truelove et al., 2017), incluso algunas especies se ajustan al modelo poblacional panmítico (*Sparisoma viride*, Lorea-Padilla et al., 2021; *Clibanarius tricolor*, Stark et al., 2021; *Sparisoma aurofrenatum*, Velasco-Montoya et al., 2022). En general, es el tiempo del periodo larval de *N. tessellata* y *M. furnieri* lo que definió la estructura filogeográfica con una sola población para ambas especies. También les permite tener una alta conectividad genética entre las localidades, siendo la corriente Caribe y la Contracorriente Caribe responsables de dispersarlas a lo largo del Caribe sur ante la presencia de las barreras putativas evaluadas.

### 3.5.1.2 Especies de bajo potencial de dispersión

Con respecto a las otras especies de fondos rocosos (*A. rivasi* y *C. pica*) y de fondos blandos someros (*M. melongena* y *S. proops*), los análisis de diferenciación genética, bayesiano y PCA permitieron identificar tres poblaciones ( $K=3$ ). La existencia de las tres poblaciones para cada especie fue confirmada con los análisis de varianza molecular (AMOVA) cuando se asumió un  $K=3$ . La delimitación de las tres poblaciones difiere entre las cuatro especies subestructuradas genéticamente y están bajo la influencia de las barreras putativas evaluadas. Por ejemplo, basado en el estadístico  $\Phi_{CT}$  de las AMOVAs, fue posible medir el nivel de diferenciación genética entre las muestras clasificadas a cada lado de las barreras. Para el caso de *A. rivasi* y *C. pica*, en ambas especies la primera población se ubicó en el Cabo de la Vela, la segunda en Santa Marta y están separadas por la barrera que se definió como un efecto combinado de la ausencia del fondo y litoral rocoso somero en una distancia mayor a 300 km de borde costero (AFR) y el área de afloramiento semi permanente en La Guajira (APG; de aquí en adelante AFR+APG). Esta barrera afecta de manera significativa a *A. rivasi* ( $\Phi_{CT}=0,406$ ) y *C. pica* ( $\Phi_{CT}=0,224$ ), y en una mínima proporción a *N. tessellata* ( $\Phi_{CT}=0,005$ ). La tercera población se determinó entre las localidades de Cartagena, Isla Fuerte y Capurganá, separada de la segunda por la barrera de la pluma del río Magdalena (PRM). Esta barrera tiene un efecto importante en *A. rivasi* ( $\Phi_{CT}=0,420$ ) y en menor grado en *C. pica* ( $\Phi_{CT}=0,076$ ), siendo para esta última una barrera permeable al flujo genético. Esto tiene sentido, porque *C. pica* presenta un PLD de menos de 6 días (Bell, 1997; Velazco y Barros, 2017) y es posible que ese tiempo sea suficiente para que las larvas producidas en Cartagena sean transportadas hacia Santa Marta por medio de la Contracorriente Caribe (CCC; conocida también como la Contracorriente Panamá-Colombia). Esta corriente, que deriva del Giro Panamá-Colombia (Andrade, 2001), con el debilitamiento de los vientos alisios del nororiente las aguas superficiales se mueven sobre la plataforma continental hacia el norte y nororiente hasta el frente de La Guajira (Bernal et al., 2006; Andrade, 2001; Orfila et al., 2021). La CCC también puede ser la responsable de mantener una alta conectividad genética entre Capurganá y Cartagena, donde se constituye la tercera población de *C. pica*.

El análisis filogenético confirmó la anterior propuesta filogeográfica para *A. rivasi* y *C. pica*; sin embargo, en el caso de *C. pica* solo se configuraron dos clados en los árboles ML y Network, uno a cada lado de la barrera AFR+APG. A pesar de lo anterior, en el clado 2 se observa cómo las muestras de Santa Marta están más relacionadas entre sí, pero separadas del resto de localidades y conformando un subclado dentro de éste con un soporte de 53%. Esto permite concluir que *C. pica* presenta evidencia del efecto de una sola barrera biogeográfica (AFR+APG), mientras que para *A. rivasi* se observa el efecto simultáneo de las dos barreras evaluadas (AFR+APG y PRM). Estos resultados llaman la atención porque en una distancia menor a 400 km de borde costero se identificó la acción de dos barreras para una especie arrecifal como *A. rivasi*. Lo curioso es que las especies del género *Acanthemblemaria* presentan una propuesta de PLD de 22 a 25 días (Johnson y Brothers, 1989). Si esto es así para *A. rivasi*, bajo este escenario

de potencial de dispersión se esperaría que sólo sea afectada por una de las dos barreras, como ocurre en *C. pica*. Sin embargo, parece ser que el PLD no es un atributo biológico determinante en el patrón filogeográfico de este pez. Miembros de la familia Chaenopsidae se caracterizan por tener cuidado parental de huevos por parte de los machos, baja fecundidad y habitar orificios de esqueletos de invertebrados que están incrustados en rocas o corales en zonas del arrecife con alta energía de oleaje (Acero, 1984; Hastings, 1988; Johnson y Brothers 1989); además, miembros de esta familia, principalmente del género *Acanthemblemaria*, presentan retención larval cerca a los arrecifes (Brogan, 1994; Ramírez y García, 2003). Estas características y aspectos de la ecología larval (aún desconocidos) posiblemente generan en *A. rivasi* una alta retención larval con elevados porcentajes de reclutamiento biológico en las poblaciones locales del Cabo de la Vela y Santa Marta que, en consecuencia, definen el alto nivel de subestructuración genética observado. Este fenómeno observado en *A. rivasi* permitió que recientemente se propusiera una nueva especie distribuida desde Santa Marta hacia Venezuela, pero sin datos genéticos de Colombia (*A. aceroides*, Hasting et al., 2020). Sin embargo, el alto nivel de diferenciación genética observado entre los tres clados (Cabo de la Vela Vs. Santa Marta Vs. Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá;  $\Phi_{CT}=0,495$ ,  $p<0,05$ ) sugiere una mayor revisión en el que se combinen marcadores moleculares mitocondriales, mirística y morfología para verificar la presencia de una especie adicional en el complejo *A. rivasi*.

Por otro lado, se puede cuestionar ¿Qué sucede con las larvas de *A. rivasi* y *C. pica* que son transportadas aguas afuera del fondo rocoso? Para el caso del Cabo de la Vela y Santa Marta, el afloramiento semi permanente en La Guajira (APG) y estacional en Santa Marta genera corrientes superficiales que transportan masas de aguas lejos de la línea costera, que luego se suman a las transportadas por la Corriente Caribe que van hacia el Caribe Central (Andrade, 2001; Gómez y Acero, 2020; **Figura 1-3**). Esto explicaría el alto nivel de diferenciación genética en ambas especies entre esas localidades. En contraste, las larvas que salen del sistema arrecifal de los sectores de Cartagena (Tierrabomba, Isla de Barú, Islas del Rosario y San Bernardo), Isla Fuerte y Capurganá son transportadas por CPC (Bernal et al., 2006; Andrade, 2001; Orfila et al., 2021) y puede ser las responsables de homogenizar genéticamente estas localidades. Esta corriente se ha propuesto como el factor físico que facilita el intercambio de información genética entre las poblaciones de varias especies marinas no significativamente subestructuradas en el suroccidente del Caribe (*S. partitus*, Ospina et al., 2008; *L. synagris*, Landínez-García et al., 2009; *L. schmitti*, Valle et al., 2015; *R. porosus*, Almanza et al., 2016; *C. hippos*, Caiafa et al., 2018; *Orbicella faveolata*, Alegría-Ortega et al., 2021; *P. notialis*, Atencia et al., 2021). Genera, además, retención de larvas del pez *Mugil incilis* dentro del golfo de Morrosquillo y diferenciación genética con las demás localidades del Caribe Sur (Mendoza et al., 2019).

Para el caso de las especies de fondos blandos, la distribución de las tres poblaciones fue diferente. Se destaca *S. proops* por presentar un efecto combinado de dos barreras

putativas que delimitan las tres poblaciones, una de ellas no documentada. La primera población está ubicada en La Guajira (Dibulla-Punta Gallinas) y la segunda se ubica entre Magdalena (golfo de Salamanca) y Atlántico (costado occidental de Bocas de Ceniza); ellas están separadas por la barrera del estrechamiento de la plataforma continental en el sector del PNN Tayrona (SNSM;  $\Phi_{CT}=0,375$ ). La tercera población está ubicada entre Córdoba (golfo de Morrosquillo) y Antioquia (golfo de Urabá) y se separa de la segunda por una posible barrera existente en el sector costero del departamento de Bolívar ( $\Phi_{CT}=0,472$ ). Cuando se propuso PRM como barrera, el efecto, aunque significativo, no fue mayor al de las otras dos barreras ( $\Phi_{CT}=0,275$ ). Para el caso de *M. melongena*, SNSM fue la barrera que afectó únicamente su estructura filogeográfica de manera significativa ( $\Phi_{CT}=0,317$ ), dado que el efecto de PRM fue bajo ( $\Phi_{CT}=0,080$ ). Este análisis fue congruente con los árboles filogenéticos, en el que sólo se observaron dos clados separados por el quiebre causado por SNSM. Un clado clasifica las muestras de La Guajira y el otro incluye todas las muestras de Magdalena hasta Antioquia.

Estos resultados sólo coinciden con dos especies de camarón que han sido estudiadas en el Caribe Sur del sector de Colombia. Se trata de los camarones *Littopenaus schmitti* (Valle et al., 2015) y *Penaeus notialis* (Atencia et al., 2021). Estas especies habitan el fondo blando somero de la plataforma continental cerca de lagunas costeras y estuarios. En ambas especies coincide que una de las poblaciones está ubicada en La Guajira y las otras dos se distribuyen diferencialmente entre el Magdalena y Antioquia. De los dos camarones, sólo *P. notialis* presenta una señal de un posible quiebre entre La Guajira y la localidad más cercana que fue en Bolívar, con un valor de  $F_{ST}$  de 0,103 ( $p<0,001$ ). A esta especie se suma el tiburón toyo *Rhizoprionodon porosus*, el cual presentó dos poblaciones con marcadores loci microsatélites y región control del ADNmt. El estudio también determinó una población en La Guajira y la segunda está distribuida entre el Magdalena y Córdoba (Almanza, 2014; Almanza et al., 2016).

### 3.5.1.3 Identificación de los quiebres filogeográficos

El análisis filogeográfico de las seis especies permitió determinar la acción de las barreras putativas sobre la estructura genética de especies marinas del Caribe Sur, que incluye el sector de Colombia. Por primera vez se suministra evidencia de un quiebre filogeográfico causado por la pluma del río Magdalena (PMR), principalmente para *A. rivasi*. El río Magdalena le entrega anualmente al sur del mar Caribe  $142 \times 10^6$  ton/año de sedimentos. Su pluma se extiende hasta 6.5 km dentro del mar y se caracteriza por presentar una alta concentración de turbidez ( $178,6 \pm 78,7$  mg/L), que se equipara con las estimaciones de los ríos Amazonas y Yangtsé (Torregroza et al., 2020). Además, en su área de influencia logra diluir la salinidad de  $10,8 \pm 3,4$  en la desembocadura a  $28,4 \pm 0,4$  en el sector marino adyacente (Torregroza et al., 2021). Estas condiciones fisicoquímicas y la influencia que logra tener en el sector marino del Caribe hacen suponer que la PMR debe estar actuando como barrera biogeográfica para especies marinas que tienen limitación en su dispersión, principalmente en aquellas que de algún modo sus larvas pelágicas al tratar de atravesar esta área no logran sobrevivir. Quizás no logran tolerar la

disminución de la salinidad, los 2°C de temperatura por encima de las aguas marinas frente a Santa Marta-Cabo de la Vela, y la alta turbidez de las aguas, siendo así los posibles factores que regulan el éxito de la dispersión biológica.

La PRM se propuso históricamente como barrera en el Caribe sur. Pero muchos estudios se caracterizaron por no tener un buen diseño experimental no fueron concluyentes. Esto se debió a que los estudios no tomaron en cuenta localidades de Colombia (Baums et al., 2005; Díaz-Ferguson et al., 2010; Porto-Hannes et al., 2014; Devlin y Baums, 2017; Rippe et al., 2017); y cuando se consideraron, sólo muestrearon un costado de PRM (Foster et al., 2012; Alegría-Ortega et al., 2020). Sin embargo, cuando los estudios contemplaron ambos costados y seleccionaron especies con larva pelágica de más de 12 días de duración, la hipótesis de proponerla como barrera fue rechazada (*S. partitus*, Ospina-Guerrero et al., 2008; *L. synagris*, Landínez et al., 2009; *L. schmitti*, Valle et al., 2015; *C. hippos*, Caiafa et al., 2018; *M. incilis*, Mendoza et al., 2019; *E. lucunter lucunter*, Benavides, 2020; *P. notialis*, Atencia et al., 2021; *S. viride*, Loera-Padilla et al., 2021; *O. insularis*, Puentes, 2021; *S. aurofrenatum*, Velasco-Montoya et al., 2022). A pesar de lo anterior, otros escenarios del mundo describen especies marinas con quiebres filogeográficos por plumas de grandes ríos. Por ejemplo, la pluma del río Amazonas ha sido objeto de estudios biogeográficos en peces arrecifales en el que se demuestra una separación de la fauna de peces del Gran Caribe con la de Brasil (Rocha et al., 2003). Revisiones recientes también la documentan como una barrera a la dispersión de especies de todos los reinos, generando un patrón espacial en la estructuración de la diversidad de especies marinas entre el Gran Caribe y Brasil (Tosetto et al., 2022). A nivel filogeográfico, se tienen especies que no la afecta. Es el caso de los peces arrecifales *Chaetodon striatus* (Liedke et al., 2020) y *Abudefduf saxatilis* (Piñeros y Gutiérrez-Rodríguez, 2017), los cuales presentan flujo genético entre localidades del Caribe y el norte de Brasil. Es la corriente del norte de Brasil que fluye hacia el Caribe, pasando por la plataforma de la pluma del río Amazonas, la que promueve la conectividad genética de *A. saxatilis* entre ambos sectores (Piñeros y Gutiérrez-Rodríguez, 2017). En contraste, se ha demostrado que actúa como barrera para los peces arrecifales *Chromis multilineata* y los del género *Halichoeres*, demostrando niveles de diferenciación genérica entre muestras del Gran Caribe con localidades de Brasil e islas del Atlántico Central (Rocha et al., 2005, 2008). También se observó en el pargo rayado *L. synagris* cuando se compararon muestras de Colombia con las de Brasil (Silva et al., 2018). Para el caso de invertebrados marinos, se documentó un quiebre filogeográfico causado por otra pluma de río. Se trata de la lapa *Cellana toreuma* distribuida en las costas de China, donde la pluma del río Yangtsé causa un quiebre filogeográfico (Dong et al., 2012).

El otro hallazgo fue el efecto que causa la ausencia del fondo y litoral rocoso en una distancia de línea de costa por más de 300 km ubicada entre el Cabo de la Vela y el sector de Santa Marta, la cual opera para *A. rivasi* y *C. pica*. El litoral rocoso se constituye en el hábitat específico para ambas especies, el cual en Caribe sur tiene una

distribución heterogénea (Benavides, 2020). Sin embargo, la ausencia del fondo y litoral rocoso somero en este sector coincide con el afloramiento semi permanente de La Guajira y, por lo tanto, podría tratarse de un efecto combinado para generar el quiebre filogeográfico en las dos especies. Esta barrera no se había documentado con mayor soporte científico (Benavides, 2020; Velasco-Montoya et al., 2022) y lo interesante es que las dos especies evaluadas contrastan en sus historias de vida larval a lo que se podría pensar en una señal del efecto generalizado de la barrera sobre las comunidades de organismos marinos dependientes de los fondos rocosos del Caribe sur (Aspecto III, Avise, 2009). Una situación similar se presenta en el suroriente de Australia, donde tres especies asociadas al litoral rocoso presentan un quiebre en la conectividad genética debido a la existencia de una barrera biogeográfica configurada por más de 300 km de litoral arenoso. Esta estructura física está correlacionada con la historia de vida larval para explicar el patrón filogeográfico (Ayre et al., 2009). Entre las tres especies se tiene el chitón *Plaxiphora albida*, el balano *Catomerus polymerus* y la lapa *Cellana tramoserica*, teniendo estas dos últimas una larva pelágica que dura 48 horas y 16 días de vida, respectivamente.

También hay pruebas de cómo las zonas de afloramiento afectan a la estructura genética y filogeográfica de las especies marinas. Por ejemplo, el afloramiento en el Cabo Blanco (Oregón) y el Cabo Mendocino (California) afecta a la estructura genética del percebe *Balanus glandula* (Sotka et al., 2004) y a cinco especies de la comunidad intermareal rocosa (Kelly y Palumbi, 2010), respectivamente. A lo largo de la costa del Pacífico suroriental, el gasterópodo *Crepidatella dilatata* (Brante et al., 2012) y el isópodo de playa *Excirrolana hirsuticauda* (Haye et al., 2019) exhiben una ruptura a los 32°S, un área de transición caracterizado por un afloramiento. El pez *Pomatomus saltatrix* la exhibe en la zona de afloramiento de la corriente de Benguela (Reid et al., 2016); y el pez *Sebastes thompsoni* entre dos sectores del Mar del Este, que puede estar relacionado con patrones de corriente como remolinos y afloramiento (Yu y Kim, 2018). Lo anterior demuestra la importancia de seguir investigando los efectos de la barrera AFR+APG sobre otras especies que habitan las costas rocosas y los arrecifes del Caribe Sur. Idealmente, las futuras investigaciones deben darse en un enfoque multiespecífico que incluya especies de diferentes grupos taxonómicos para probar si los efectos de la barrera son generalizados en toda la comunidad marina asociada a este ecosistema (Avise, 2009).

En lo que respecta a las especies de fondo blandos, se observó la influencia del estrechamiento de la plataforma continental debido a las estribaciones de la SNSM en el sector de Santa Marta causando una ruptura genética entre Punta Gallinas e Isla de Salamanca sobre *M. melongena* ( $\Phi_{CT}=0,353$ ,  $p<0,05$ ) y *S. proops* ( $\Phi_{CT}=0,364$ ,  $p<0,05$ ). Estas especies coinciden en la historia de vida larval, las cuales carecen de larva pelágica que influye directamente en el alto nivel de diferenciación genética observado entre las muestras de La Guajira y las recolectadas en Salamanca. En su proceso reproductivo, las hembras de *M. melongena* producen ovicapsulas donde depositan los huevos y las larvas eclosionan en su interior, desarrollándose completamente hasta

alcanzar la etapa de postlarva para salir y quedar vinculadas al fondo. *Sciades proops*, por su parte, presenta baja fecundidad e incubación oral de huevos y cuidado parental por los machos, también careciendo de larva pelágica. Sin duda, estas estrategias reproductivas en ambas especies limitan su dispersión entre La Guajira y Magdalena. Este accidente geológico también causó una ruptura en la conectividad genética de los ariidos *Cathorops mapale/wayuu* entre las aguas someras de los departamentos de La Guajira y de Magdalena (Betancur et al., 2010). Adicionalmente, estudios biogeográficos han demostrado efectos importantes del estrechamiento de la plataforma en Santa Marta sobre la distribución de algunas especies marinas de diferentes grupos taxonómicos (Betancur et al., 2010). Existen especies de fondos blandos menores de los 120 m de profundidad que su distribución se limita hasta uno de los costados de esta barrera. Para citar algunos ejemplos se tienen los caracoles *Siratus (Murex) thompsoni* y *Poirieria (Pazinotus) gatunensis*, los cuales están distribuidos en el Caribe Sur desde La Guajira hasta Venezuela y ausentes en el costado occidental de la barrera (Díaz, 1995). El bagre *Notarius neogranatensis*, a parte de ser endémica de Colombia, está restringida en las costas de Antioquia, Córdoba y Sucre (Acero y Betancur, 2002). También se tiene el caso de las estrellas de mar *Echinaster echinophorus*, *E. sentus* y *E. serpentarius*, que se distribuyen en aguas someras menores de 107 m de profundidad en las costas de Florida, México, Costa Rica, Panamá hasta Colombia en el costado occidental de la barrera SNSM (Benavides et al., 2011). Lo opuesto ocurre con la estrella *Pawsonaster parvus*, la cual está únicamente presente en La Guajira a menos de 60 m de profundidad (Benavides et al., 2011). Otra anotación sobre el efecto de esta barrera es la distribución de la raya *Urobatis jamaicensis*, la cual está distribuida en ambos costados de la barrera SNSM, pero no se encuentra en los sectores de Santa Marta y el Parque Tayrona. Es probable que durante el desplazamiento de la Sierra Nevada hace 0.75 millones de años (Betancur et al., 2010) los miembros de la población de estos sectores fueran arrojados al fondo del mar y hasta la fecha *U. jamaicensis* no ha podido recolonizarlos debido al estrechamiento de la plataforma (A. Acero, comunicación personal, 2 de mayo de 2022).

En lo que respecta a *M. melongena*, se le suman otros factores como la acción del afloramiento semi permanente en La Guajira y la presencia de pocas lagunas costeras (bahías Hondita y Honda y Ciénaga de Navío Quebrado), que son fundamentales para el cumplimiento de su ciclo de vida (Hernández y Stotz, 2004). Para el caso de las demás localidades ubicadas desde isla de Salamanca hacia el golfo de Urabá, se observó una tendencia de homogenización genética entre las localidades de Magdalena y Bolívar debido a la presencia de hábitats de fondos blandos y ambientes salobres muy cercanos entre sí, como lagunas costeras (Ciénaga Grande, ciénaga de Mallorquín, ciénagas de Galerazamba, ciénaga de la Virgen e influencia del Canal del Dique y del Santuario FF El Corchal) y la influencia del río Magdalena que genera ambiente estuarino en su desembocadura. Sin embargo, las segundas poblaciones que se determinaron para *M. melongena* y *S. proops* se restringen hasta Bolívar; al parecer los sectores arrecifales ubicados entre Bolívar y Sucre pueden estar incidiendo en la estructura genética de las especies. Es menor para *M. melongena*, por no observarse una división profunda en los



árboles filogenéticos, pero si lo es para *S. proops*. En este sentido, surge una nueva propuesta de barrera putativa para especies de fondos blandos en el suroccidente del Caribe que deberá investigarse con otros modelos biológicos. En lo referente a las muestras recolectadas entre los golfos de Morrosquillo y Urabá, presentaron homogenización genética explicada principalmente por la Contracorriente Caribe y la presencia cercana de ambientes estuarinos y salobres, como la ciénaga La Caimanera, bahía Cispatá y las plumas de los ríos Sinú y Atrato, que podrían facilitar el movimiento de animales juveniles y adultos de ambas especies, principalmente los de *S. proops*.

### 3.5.2 Modelo poblacional de especies que contrastan en el potencial larval

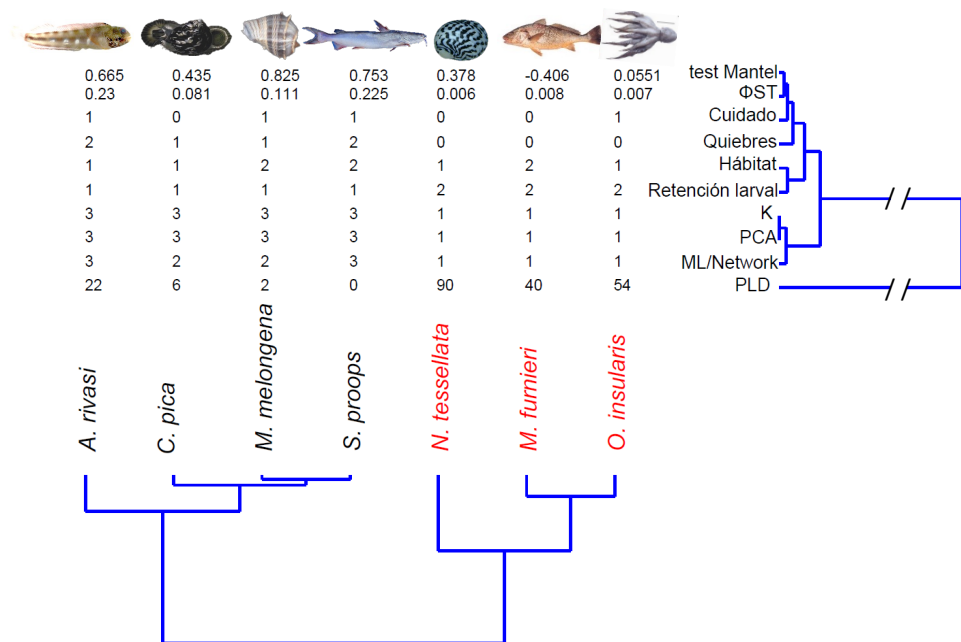
Una de las premisas en genética de poblaciones es que las especies estructuradas genéticamente se ajustan al modelo de aislamiento por distancia (IBD), en la que muestras de lugares cercanos son menos diferentes genéticamente que con aquellas que están más alejadas (Bohonak, 2002). Sin embargo, las especies que están muy bien estructuradas pueden presentar falsos positivos al probarse el modelo de IBD por medio de las pruebas de autocorrelación espacial entre las distancias genéticas y geográficas (Meirmans, 2012; Diniz-Filho et al., 2013). Esto se debe a que muchas especies experimentaron en el pasado separaciones abruptas que en el presente se evidencian con altos niveles de divergencias genéticas. Es así que los análisis de la prueba de Mantel y los correlogramas de Mantel realizados en las cuatro especies que exhiben quiebres filogeográficos, permitieron determinar que ninguna se ajustó al modelo IBD. Por el contrario, estos análisis permitieron probar que se ajustan al modelo jerárquico de poblaciones (Merimans, 2012). Este modelo coincide con aquellas especies que presentan cambio genético abrupto ante una barrera biogeográfica en un ámbito geográfico (Hellberg et al., 2002) y que, a pesar de eso, en el gráfico se puede observar la relación lineal entre las distancias geográficas y genéticas (aunque no sean significativas). Esto es producto de las relaciones genéticas entre las subpoblaciones dentro de cada clado que sesga la prueba al sugerir ajuste al modelo IBD. Para *A. rivasí*, *C. pica*, *M. melongena* y *S. proops* fue posible detectar el efecto de las barreras en la relación de las dos distancias (**Figure 3-9; Figure 3-10**). En los gráficos de correlación de las cuatro especies se observan hasta tres grupos de relaciones. Una hacia la parte superior de la línea de tendencias, donde se observan las relaciones de parejas de datos de La Guajira con el resto de las localidades y hacia abajo las de Bolívar, Córdoba y Antioquia; mientras que en la mitad se observan las parejas de datos del Magdalena con las de Atlántico, Bolívar, Córdoba y Antioquia. Para *N. tessellata* y *M. furnieri*, los análisis de la prueba de Mantel mostraron una baja correlación entre las distancias geográficas y genéticas, que no fueron significativas, como en *N. tessellata*. En ambos casos, los valores de la pendiente de la regresión lineal entre las dos variables tendieron a cero. Estos resultados, los del AMOVA y los bajos valores de  $\Phi_{ST}$ , sugieren que ambas especies se ajustan al modelo de poblaciones abiertas o panmícticas (Hellberg et al., 2002).

En el área geográfica estudiada se han investigado especies que no se ajustan al modelo poblacional IBD. Esto coincide para especies con altos valores de PLD y bajos niveles de diferenciación genética estimados a partir de loci de microsatélites, como en el caso de *S. partitus* (Ospina et al., 2008), *L. synagris* (Landínez-García et al., 2009), *C. hippos* (genes mitocondriales, Caiafa et al., 2018), *M. incilis* (Mendoza et al., 2019), *E. lucunter lucunter* (Benavides, 2020), *O. insularis* (Puentes, 2021) y *Mugil liza* (Aguirre et al., 2022). Hay un efecto bajo de las distancias geográficas sobre las distancias genéticas que genera un proceso de homogenización genética entre las localidades estudiadas. Por el contrario, la revisión bibliográfica permitió identificar que el camarón *P. notialis* es la única especie que se ajusta al modelo IBD (Atencia et al., 2021). Para esta especie se determinó un K de tres poblaciones, siendo las muestras de La Guajira las más diferentes genéticamente del resto de localidades.

### 3.5.3 Concordancia filogeográfica entre especies

Los factores de concordancia filogeográfica permiten cuantificar el grado de congruencia filogeográfica entre especies para saber cuáles comparten un patrón filogeográfico. En el pasado, los estudios de filogeografía compararon las filogenias entre múltiples taxones de forma cualitativa e interpretaron la similitud como una respuesta compartida a un evento histórico (Avice, 2000; Barber et al., 2006; Dawson et al., 2006). Sin embargo, se avanzó en las propuestas cuantitativas que permiten tener una medida de similitud/concordancia entre las filogenias, las cuales se acompañan de un nivel de significancia para darle un soporte a estos análisis (Larget et al., 2010; Campbell et al., 2011; Kendall et al., 2018). A los procesos analíticos se suman las consideraciones importantes de muestrear varias especies codistribuidas para cumplir con el Aspecto II de multiespecies y de utilizar varios loci que va en concordancia con el Aspecto III de multilocus (Avice, 2009). La mayoría de los trabajos de filogeografía comparada fueron realizados con dos (Arndt y Smith, 1998; Diaz-Ferguson et al., 2012; Modica et al., 2017; Mattos et al., 2019; Simon et al., 2021) y más de dos especies marinas que contrastan en el potencial larval (Kyle y Boulding, 2000; Hellberg et al., 2002; Siegel et al., 2003; Sotka et al., 2004; Cowen et al., 2006; Goldstien et al., 2006; Ayre et al., 2009; Betancur et al., 2010; Kelly y Palumbi, 2010; Haye et al., 2014; Modica et al., 2017; Mattos et al., 2019). Algunos utilizaron un solo locus; otros combinaron dos a más marcadores mitocondriales; y algunos sumaron los loci de SNPs. La mayoría de los trabajos concluyen que no todas las especies codistribuidas presentan filogenias idénticas, debido a la incongruencia de la topología de los árboles y de los tiempos de divergencia de los clados. Esto se debe a que cada especie está respondiendo de manera diferencial a los factores responsables del quiebre filogeográfico y a los factores biológicos de las mismas especies involucradas (Ayre et al., 2009; Gutiérrez y Vázquez, 2011; Papadopoulou y Knowles 2015). En este estudio se distinguieron dos conjuntos de especies. Las que presentaron quiebre filogeográfico ante las barreras putativas evaluadas y las que no fueron susceptibles a ellas. Las del primer grupo tienen respuestas diferenciales a las barreras.

*Acanthemblemaria rivasi* fue la especie del fondo rocoso somero que presentó dos quiebres filogeográficos ante las barreras ALR+APG y PRM; mientras que *C. pica* sólo fue afectada por ALR+APG. Aunque presentaron un alto nivel de congruencia genética y topológica por el método de Campbell et al. (2011), el factor de concordancia de Kendall et al. (2018) presentó un valor de 0.5 que indica una señal de incongruencia entre la distribución de las categorías de la topología de sus dendrogramas. Para el caso de las especies de fondos blandos, se observó una mayor incongruencia en el patrón filogeográfico. *Sciades proops* también presentó dos quiebres filogeográficos, mientras que *M. melongena* presentó uno. Todo esto explica que estas especies, de acuerdo a su historia de vida y a la forma en que responden al ambiente contemporáneo e histórico, moldearon de manera diferente la estructura filogeográfica observada. De manera general, este grupo de cuatro especies se caracterizan por el bajo potencial de dispersión atribuido a un PLD de cero (*M. melongena* y *S. proops*) a pocos días (*C. pica*); presentar un tipo de cuidado parental (de huevos en *A. rivasi*, larvas en *S. proops*; ovcapsulas en *M. melongena*) y baja fecundidad (*A. rivasi* y *S. proops*). En el caso de los atributos genéticos, estas especies presentan altos valores de  $\Phi_{ST}$  ( $>0.08$ ), un  $K=3$  y de dos (*C. pica*, *M. melongena*) a tres clados (*A. rivasi* y *S. proops*) en los análisis filogenéticos. Mientras que las del otro grupo (*N. tessellata* y *M. furnieri*) se caracterizan por ser de alto potencial de dispersión. Ellas presentan PLD mayor de 30 días, son altamente fecundas, no hay cuidado parental y no están subestructuradas genéticamente ( $\Phi_{ST} < 0.01$ ;  $K=1$ ; 1 clado) (Figure 3-13).



**Figura 3-13.** Análisis de clúster utilizando el método de agrupamiento de Ward a partir de los atributos genéticos y biológicos de las especies asociadas a fondos rocosos y blandos someros del Caribe Sur, sector de Colombia.



## 4. Congruence between microsatellite loci, SNPs, and COI gen reveals a phylogeographic break in the southern Caribbean Sea: the case of West Indian top shell *Cittarium pica* (Gastropoda: Tegulidae)<sup>2</sup>

### 4.1 Abstract

It has been proposed that species associated with shallow rocky bottoms in the southern Colombian Caribbean Sea are affected by two biogeographic barriers: the Magdalena River plume (MRP) and the combination of the absence of rocky bottoms and the almost permanent upwelling in The Guajira peninsula (ARB+PUG). We evaluated whether these barriers had generalized genomic effects on the phylogeographic structure of the West Indian top shell (*Cittarium pica*), a crucial fishery resource in many areas of the Caribbean Sea. Ten species-specific microsatellite loci, 55,112 SNPs from ddRADseq, and COI gene were used on samples of *C. pica* collected at five Colombian localities (Cabo de la Vela; Santa Marta; Cartagena; Isla Fuerte; and Capurganá). Genetic structure analyses performed for microsatellite and SNP loci indicated that there are three genetic groups of *C. pica* in Colombia (pop 1: Cabo de la Vela; pop 2: Santa Marta; pop 3: Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá). However, both SNPs and COI gene were congruent in showing a phylogeographic break caused by only the ARB+PUG (AMOVA:  $\Phi_{CT}$ -SNP = 0.224,  $p < 0.05$ ;  $\Phi_{CT}$ -COI = 0.722,  $p < 0.05$ ), which was confirmed by the maximum-likelihood and

---

<sup>2</sup> Este capítulo fue aceptado para publicación en la revista Fisheries Research. **Narváez-Barandica, J.C.**, Quintero-Galvis, J.F., Caruso Vargasa, A., Blanco Cervantes, G., Aguirre-Pabón, J.C., Castro, L.R., Betancur, R., Acero P., A. (*in press*) Congruence between microsatellite loci, SNPs, and COI gen reveals a phylogeographic break in the southern Caribbean Sea: the case of West Indian top shell *Cittarium pica* (Gastropoda: Tegulidae). *Fisheries Research*.

network trees. In contrast, MRP was shown to be a permeable barrier to gene flow. Demographic history analysis indicated that *C. pica* experienced historical changes in population size during the last glaciation period. *Cittarium pica* is a biological model to demonstrate how the ARB+PUG barrier could affect marine organisms living in shallow rocky habitats, mainly those lacking larvae or having a short-lived larval phase in the southern Caribbean Sea. Finally, some recommendations for fisheries management and conservation *C. pica* populations are discussed.

## 4.2 Introduction

Ocean has been considered a continuous environment regarding genetic connectivity between populations. However, most population genetics studies have shown that some factors regulate genetic flow in a segregated way in taxa with contrasting life histories (Hellberg et al., 2002; Avise, 2009; Ayre et al., 2009; Pelc et al., 2009; Betancur et al., 2010; Miloslavich et al., 2010; Derycke et al., 2013; Fenberg et al., 2014; Mattos et al., 2019). Some of the main regulatory factors that have been mentioned as being capable of breaking genetic flow between populations are marine currents, changes in physical and chemical properties of seawater caused by river plumes and zones of upwelling, variation in the coastal line geomorphology, and absence of specific habitat (Pelc et al., 2009; Cowman and Bellwood, 2013; Derycke et al., 2013; Fenberg et al., 2014; Mattos et al., 2019).

Phylogeographic and population genetics studies in the Great Caribbean in coral and mollusk species suggest the existence of a break in the genetic connectivity between the continental and the insular Caribbean (Taylor and Hellberg, 2003; Baums et al., 2005; Díaz-Ferguson et al., 2010; Foster et al., 2012; Porto-Hannes et al., 2014; Devlin and Baums, 2017). This southern Caribbean break is mainly attributed to marine currents (Díaz-Ferguson et al., 2010) and oceanographic phenomena such as the Magdalena River Plume (MRP). However, there are no definitive answers because the sampling designs of some studies did not investigate the effect of Caribbean break and MRP (Narváez-Barandica et al., 2023). The major studies included no locations around MRP, or the studied models have pelagic larvae with durations longer than 12 days, which could be enough time for larvae to cross both sides of the plume. (i.e., studies in corals, fishes, and shrimp species; see: Baums et al., 2005; Ospina-Guerrero et al., 2008; Landínez-García et al., 2009; Foster et al., 2012; Caiafa et al., 2018; Mendoza-Ureche et al., 2019; Atencia et al., 2021; Loera-Padilla et al., 2021; Velasco-Montoya et al., 2022; Galvis-Quintero et al., in press). However, only one species, the coral reef fish *Acanthemblemaria rivasi*, is known to be affected by MRP (Narváez-Barandica et al., 2023).

The meridional Caribbean has been subdivided into two marine biogeographic ecoregions, the southwest and the southern Caribbean (Spalding et al., 2007). On the Colombian coastline, the marine areas located from The Guajira peninsula to the Tayrona

National Natural Park (TNNP) are included in the southern Caribbean ecoregion (*sensu stricto*), while the rest of the coastline belongs to the southwestern Caribbean (**Figura 4-1.**) (Villamizar and Cervigón, 2017). These ecoregions contrast in environmental conditions, such as sea surface temperature and salinity, which are influenced by marine currents, continental shelf geomorphology, continental water outflow, and seasonal wind-induced upwelling events (Bernal et al., 2006; Lozano et al., 2010; Gómez and Acero, 2020; Figure 1). Within the southern Caribbean ecoregion, a second barrier has been believed to be located between Santa Marta and The Guajira peninsula, which is attributed to the almost permanent upwelling (**Figura 4-1.**). The north trade winds, the Caribbean Current (CC), and Caribbean Counter Current (CCC) play a crucial role in the upwelling process (Andrade, 2015; Correa-Ramirez et al., 2020; Orfila et al., 2021). The CC originates from the North Brazil Current and flows east to west along the Venezuelan coast, bringing warm surface waters to the Gulf of Venezuela and the Central Caribbean Sea. The CCC originates from the Panama-Colombia Gyre, which flows up to a depth of approximately 100 m along the Colombian coast toward La Guajira Peninsula (Orfila et al., 2021). This current affects the water transport to Cabo de la Vela during the weakening of the north trade winds (June-November). Hence, when these currents meet near The Guajira peninsula, offshore winds and the Coriolis effect cause deeper nutrient-rich waters, which rise to the surface (Correa-Ramirez et al., 2020). Additionally, the Guajira Peninsula experiences a strong upwelling from December to May due to high-intensity trade winds. However, the effect is weaker from June to August, mainly concentrated at the northern end of the peninsula. Another upwelling occurs around Santa Marta (including the TNNP) during the peak of northern trade winds from December to March. The upwelled water is transported offshore by surface currents and added to the water carried by CC towards the Central Caribbean (Andrade, 2015). This putative barrier would limit larval dispersal from the southwestern toward the northeast Caribbean coast of Colombia, affecting the genetic and phylogeographic structure of species associated with coral reefs and shallow rocky bottoms (Narváez-Barandica et al., 2023). Additionally, a third barrier of continental origin significantly impacts the phylogeography of marine patterns in the southern ecoregion. This is the Caribbean Sea outskirts of the Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), which literally eliminated the continental shelf on the Colombian northeast shore (Rangel and Idárraga, 2010), affecting principally species inhabiting shallow soft-bottoms and lack pelagic larvae (Betancur et al., 2010; Narváez-Barandica, 2022). Finally, several studies with biologic models associated with pelagic and soft-bottom environments have demonstrated that the CCC regulates genetic connectivity (Landínez-García et al., 2009; Almanza et al., 2016; Caiafa et al., 2018; Mendoza-Ureche et al., 2019; Benavides, 2020; Atencia et al., 2021; Aguirre et al., 2022), and continental shelf geomorphology, showing a moderate level of genetic differentiation between both ecoregions (Almanza et al., 2016; Atencia et al., 2021; Aguirre et al., 2023) (**Figura 4-1.**). None of the referenced studies considered species that inhabit the exposed rocky shore. This marine ecosystem, discontinuously distributed in Colombia, is absent for more than 300 km of coastline between Cabo de la Vela (La Guajira) and TNNP, which probably also influences rocky shore species genetic and phylogeographic structure. Mollusks are the most diverse and abundant group in those ecosystems, turning their species into a biological model to

investigate how the absence of a given habitat may affect the genetic structure of its populations (Díaz, 1995).

*Cittarium pica* (Linnaeus) is a trochoid vetigastropod that inhabits the rocky intertidal zone of the Caribbean Sea. This species is distributed from the Florida Keys and the Greater Antilles to the north coast of South America (Sabelli, 1982). The presence and abundance of its populations in the natural environment seem to be related to factors such as temperature (26 – 34°C; Flores and Cáceres, 1984; Robertson, 2003), salinity (>36), slope profile (>30; Osorno et al., 2009), wave intensity (Toller and Gordon, 2005), and type of substrate. An important aspect to consider in terms of the population dynamics of this species is the short duration of its pelagic larvae (3–6 days; Bell, 1997; Velazco and Barros, 2017), which considerably limits its dispersion capacity to colonize new substrates and achieve recruitment (Mitton et al., 1989). Furthermore, its mobility in the benthic phase is extremely low, and movements shorter than 100 m have been recorded in adult individuals over six months (Osorno et al., 2009). Those characteristics demonstrate its limited dispersion capacity, which precludes gene flow between distant populations, which is a factor that could influence the population structure of this species (Díaz-Ferguson et al., 2010).

In terms of economic significance, *C. pica* is considered the second most important gastropod in the Antilles (Robertson, 2003), whereas on the north coast of South America (Colombia and Venezuela), its consumption is low, but it is of certain commercial importance (Poutiers and Cipriani, 1992; Osorno and Díaz, 2006). The overexploitation of this resource has caused a notable reduction in populations in a large part of its distribution range (Carter, 2002; Osorno and Díaz, 2006), with various studies having documented a significant reduction of the largest individuals in areas close to human populations, principally in localities void of legal protection or that facilitate gathering (Toller and Gordon, 2005; Osorno and Díaz, 2006; Daza et al., 2018). For those reasons, *C. pica* is categorized as Vulnerable in the Colombian red list of threatened marine invertebrates (Chasqui et al., 2022).

The scenarios of MRP, the almost permanent upwelling, and the absence of exposed rocky shore habitat located between Cabo de la Vela and TNNP become essential to know how to affect the phylogeography of rocky shore species such as the West Indian top shell. Based on all the background information mentioned, we followed the multilocus approach proposed by Narváez-Barandica et al. (2023), where the microsatellite loci, SNP loci, and mitochondrial COI gene were utilized upon samples collected in five Colombian localities, including Cabo de la Vela and TNNP. Two aims were evaluated: 1. Determine the phylogenetic structure of *C. pica* in the presence of putative barriers, and 2. Evaluate whether there is phylogenetic congruence among the three molecular markers.



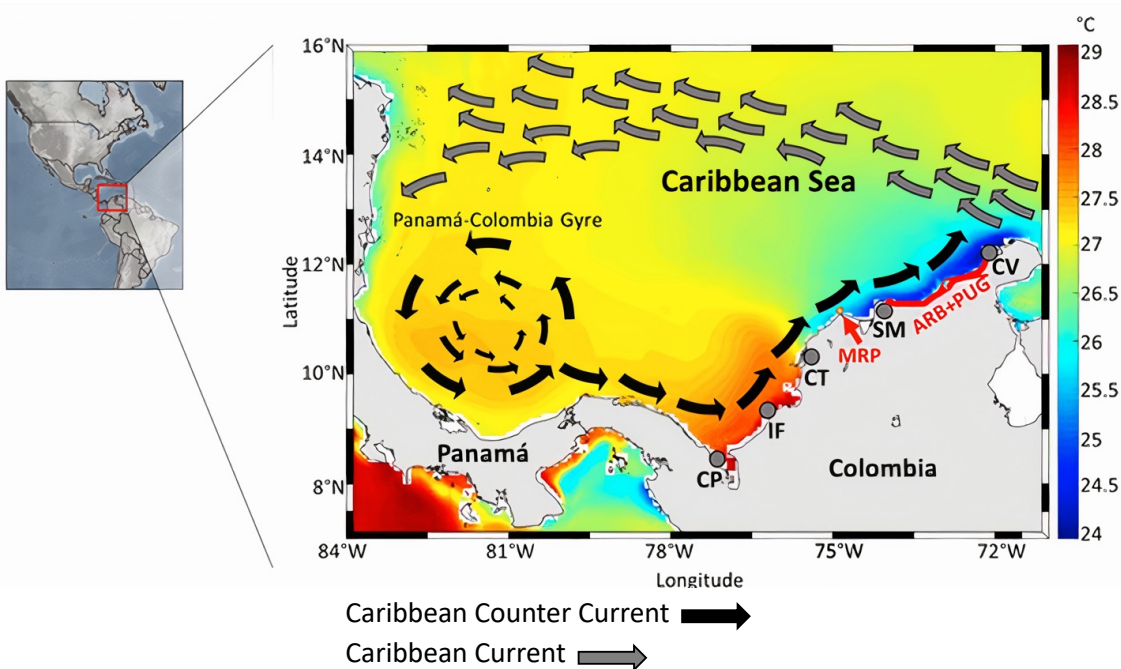
## 4.3 Materials and methods

### 4.3.1 Samples collected

A total of 360 specimens of *Cittarium pica* were randomly collected. Collections were made manually on the rocky coastline of five localities (1. Cabo de la Vela, 2. Santa Marta-PNN Tayrona, 3. Cartagena, 4. Isla Fuerte, and 5. Capurganá) (**Figura 4-1**). Foot tissue samples were fixed in 96% ethanol in 2 mL tubes (**Tabla 4-1**).

**Tabla 4-1.** Number of samples per locality and type of molecular marker for *Cittarium pica* from the Southern Caribbean, Colombia sector. Years of sampling: a. 2013; b. 2017.

Localities	Coordenates	Whole samples	Microsatellite loci <sup>a</sup>	COI gen	SNP loci <sup>b</sup>
1. Cabo de la Vela	12°12'58.0"N 72°10'41.1"W	24	24	12	20
2. Santa Marta-PNN Tayrona	11°18'51.6"N 74°11'39.1"W- 11°20'17.7"N 74°03'14.2"W	192	192	13	20
3. Cartagena	10°22'29.3"N 75°34'16.9"W-	64	64	14	20
4. Isla Fuerte	9°23'15.4"N 76°10'23.6"W	57	57	14	20
5. Capurganá	8°38'30.6"N 77°20'45.0"W	23	23	14	20
Total		360	360	67	100



**Figura 4-1.** Map of the study area, indicating the five sampling localities. CV: Cabo de la Vela. SM: Santa Marta. CT: Cartagena. IF: Isla Fuerte. CP: Capurganá. The sea surface temperature map during January 2020, which was taken and modified from CIOH (Pronóstico Climático del Caribe Colombiano No. 83. [www.cioh.org.co](http://www.cioh.org.co)). Scheme of currents based on Andrade (2001) and Correa-Ramirez et al. (2020). The two putative barriers are indicated: the Magdalena River plume (MRP) and the combination of the absence of a rocky bottom and the almost permanent upwelling in The Guajira peninsula (ARB+PUG).

#### 4.3.2 Laboratory procedures for microsatellite loci, mitochondrial COI gen and SNPs loci

The DNA was extracted from foot tissue using the commercial DNA Extraction Kit MasterPure™ from Epicentre Biotechnologies. For microsatellite loci, the amplification of ten species-specific loci (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, CP7, CP8, CP9, and CP10) was carried out in a volume of 10  $\mu$ L of final product. Using the capillary electrophoresis unit QIAGEN Qiaxcel Advanced, genotyping of the PCR products was performed using high-resolution cartridges. The size of each amplified PCR product was determined with the computer program QIAxcel ScreenGel version 1.0, employing an alignment marker between 15 and 1000 pb to standardize the sizes of the enlargements.

The COI gene sequences and samples matched only those processed with microsatellite loci. PCR was carried out at a final reaction volume of 25.6  $\mu$ L. The products between 30 and 50 ng/ $\mu$ L of DNA were purified and sequenced by Macrogen Inc. All amplification products were confirmed utilizing agarose gel electrophoresis at 2%. The primer information and PCR conditions for both microsatellite loci and the COI gene are in **Anexo 3**.

Sequences obtained for COI gen were edited and aligned with the MEGA XI software (Tamura et al. 2021). The size of the sequences was 440 bp, and they were translated into amino acids to verify the alignment and the absence of stop codons. The evolutionary model of nucleotide substitution was determined based on the Akaike information criterion (AIC) with the jModeltest v2.1.5 software (Darriba et al., 2012).

Double digest restriction-site associated DNA (ddRADseq) was used to obtain SNPs loci based on the library preparation protocol of Peterson et al. (2012). The library preparation and sequencing of ddRADseq for 95 individuals were performed using EcoRI and NlaIII enzymes. The Australian Genome Research Facility developed the laboratory procedures. The libraries were size selected, targeting fragments 280–375bp in size with the Blue Pippin (Sage Science), PCR amplified with indexed primers, and finally sequenced single-ended on the Illumina NextSeq500 with 150 cycles in high output mode (Baird et al., 2008).

The process to demultiplex reads by barcode and to remove reads with poor sequence quality or uncalled bases was developed in the process\_radtags program in STACKS v2.0 (Rochette et al., 2019). Before the assembly of the rad sequences, the optimal values of parameters *m* (minimum number of raw reads required to form a stack of a putative allele), *M* (number of mismatches allowed between putative alleles to merge them into a putative locus), and *n* (number of mismatches allowed between putative loci during construction of the catalog) were obtained following the recommendations of Paris et al. (2017). First, the RADProc pipeline (Nadukkalam Ravindran et al., 2019) was executed, selecting the 20 individuals (4 per location) with the highest number of reads. The program follows the parameters set in Stacks (*m*, *M*, and *n*) for forming new loci and building a catalog. The RADProc program tests *m*, *M*, and *n* values to determine the best parameter settings. Here, *M* values were combined from 1 to 8, *m* from 3 to 6, and *n* was set to a single value for each run (varying from 1 to 3). The output of the results allowed us to graph the number of loci, the number of polymorphic loci, and the number of SNPs of each combination of the parameter values, the highest numbers being when *M*=6, *m*=3, and *n*=2 (Paris et al., 2017). These values were established to assemble the rad loci with the denovo\_map program in STACKS v.2.0 (Rochette et al., 2019). A catalog was created to contain 55,151 loci. Then, the populations program in STACKS was run to identify the loci in the catalog. We include a minimum percentage of individuals across populations required to process a locus (*-R*=0.8) and minor allele frequency (MAF) (*--min\_maf*=0.02) to create the final filtered genotype file. Only a single SNP was retained in each locus (*--write\_single\_snp*) to minimize the negative effects of missing data when calculating frequency-based genetic distance parameters. Only individuals and loci with  $\geq 95\%$  SNPs genotyped were retained. The SNPs were also screened for allele coverage, with any SNPs displaying a local and global minor allele frequency (MAF) threshold of less than 1% removed from the dataset. In cases where multiple SNPs were found within the same read, only one locus was retained to avoid statistical bias from physical linkage. Thirty individuals with  $< 95\%$  loci genotyped were removed, which resulted in 65 individuals from five populations genotyped. The output data in variant call format (VCF)

files were used to conduct the analysis. The output VCF file was converted into different formats using PGDSpider v2.1 (Lischer and Excoffier, 2012).

### 4.3.3 Analysis of data

#### 4.3.3.1 Genetic and phylogeographic structure

The independence in microsatellite of the genotypes between pairs of loci was checked with the linkage disequilibrium test, and the deviation of Hardy-Weinberg disequilibrium was tested using the U-Score of Raymond and Rousset (1995) probability in GENEPOP version 4.1.3. The excluding null allele (ENA) algorithm implemented in the FreeNA program (Chapuis and Estoup, 2007) was used to determine the frequency of null alleles with 10,000 permutations. For the mitochondrial COI gene, the number of haplotypes, the number of polymorphic sites, and the nucleotide ( $\pi$ ) and haplotype (Hd) diversity were calculated in ARLEQUIN v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

Genetic diversity for microsatellites and SNPs was estimated by using the number of alleles/SNPs, private alleles/SNPs, observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, nucleotide diversity ( $\pi$  for SNPs), and inbreeding index (FIS) parameters in GENEPOP version 4.1.3 (Raymond and Rousset, 1995) and STACKS v.2.0 (Rochette et al., 2019). For microsatellite loci, the estimations were calculated for locality and loci using 1000 bootstraps in the computational package GENETIX v.4.05 (Belkhir et al., 2004). A scanning analysis to detect loci under selection was performed for both markers using the BayeScan v2.1 software (Foll and Gaggiotti, 2008), with 10:1 prior odd for the neutral model and 20 pilot runs consisting of 5000 iterations each, followed by 100,000 iterations with a burn-in length of 50000 iterations. The final matrix used for microsatellites and SNPs in our analyses did not have loci under selection (**Anexo 1**).

To assess the degree of population structuring, we performed a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using the  $\Phi_{ST}$  statistic and several hierarchical clusters: 1) panmictic population (without grouping); 2) effect of an absence of rocky shore habitats along the 300 km of coastline and the almost permanent upwelling in the Guajira Peninsula (Group 1. CV Vs. Group 2. SM+CT+IF+CP); 3) effect of the Magdalena River plume (Group 1. CV+SM Vs. Group 2. CT+IF+CP), and 4) grouping based on  $K=3$  (Group 1. CV Vs. Group 2. SM Vs. Group 3. CT+IF+CP). These analyses were performed in the ARLEQUIN V3.5 program (Excoffier and Lischer, 2010) for the microsatellite matrix and COI gene dataset, and the function `poppr.amova` in the `poppr` R package (Kamvar et al., 2014) was used for the SNPs matrix. Pairwise  $F_{ST}/\Phi_{ST}$  values between localities were calculated for SNPs in STACKS and for COI in ARLEQUIN V3.5. Given that the frequency of null alleles for each microsatellite locus in each population was relatively high (<43%; Supplement 3), the effect of null alleles on the analysis of population differentiation was evaluated by calculating  $F_{ST}$  with and without excluding

null alleles in the FreeNA program (Chapuis & Estoup, 2007). Additionally,  $\Phi_{ST}$  values were calculated in the GenAIEx program (Peakall et al., 2012). To test the genotypic differentiation between localities, Bonferroni correction was made for the 5% types I error.

A Bayesian structuring analysis was also carried out to determine the presence of discrete populations in the STRUCTURE program version 2.3.3 (Hubisz et al., 2009). Each run included 200000 iterations of burning, followed by 800000 MCMC iterations used to calculate a probable K between 1 and 6 populations, with seven runs for each simulated K value. Here, we assumed the mixture model (Admixture Model), the correlated allele model (Allele Frequencies Correlated), and the presence of the null alleles for the microsatellite matrix (RECESSIVEALLELES option). The number of most likely populations was determined with the methods proposed by Evanno et al. (2005), Raj et al. (2014), and Puechmaille (2016), using the STRUCTURE SELECTOR program (Li and Liu, 2018) that includes the CLUMPAK program (Kopelman et al., 2015), which was used to combine and visualize the STRUCTURE results.

Additionally, discriminant analysis of principal components (DAPC) was calculated using the R package adegenet v 2.1 (Jombart, 2008; Jombart et al., 2010). We used cross-validation to define the number of principal components (PCs) retained in the analysis, identifying the optimal point in the trade-off, between retaining too few and too many PCs in the model. We used the number of PCs associated with the lowest root mean squared error (RMSE) as the optimum number for the PCA in the DAPC analysis. Genetic partitioning was further described by calculating pairwise  $F_{ST}$  between every location in the R package adegenet v.1.3 (Jombart, 2008).

A Mantel test was performed to evaluate whether genetic distances among populations increased as a linear function of geographic distances. Coastline geographic distances were determined with Google Earth, whose coordinates are presented in Table 1. The test was developed following the proposal of Rousset (1997), where the pairwise  $\Phi_{ST}$  values were linearized [ $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ], and the geographic distances were log-transformed. The tests were performed with the mantel function of the R package vegan 2.5.7 (Oksanen et al., 2020).

#### **4.3.3.2 Phylogenetic analysis**

Phylogenetic analyses were based on consensus sequences with 65 individuals with 367,676 concatenated SNPs. The VCF file was converted to a Phylip format SNP-matrix using the Python script vcf2phylip (Ortiz, 2019) to conduct phylogenetic analysis. Maximum-likelihood (ML) analyses with IQTREE 1.3.1 (Nguyen et al., 2015) were conducted with two independent runs, including model selection for models with SNP ascertainment bias correction, 1000 ultrafast bootstrap replicates, and 10,000 iterations. IQTREE selected the TVMe+ASC+G4 model of sequence evolution following a Bayesian information criterion (BIC) model selection.

To determine the genealogical relationships among COI gene haplotypes and their locations, a network of maximal parsimony was constructed using the median-joining algorithm in the software PopArt (Bandelt et al. 1999). An ML tree was also constructed with the GTR substitution model and a correction factor of  $\Gamma=4$ , using the Akaike information criterion in jModelTest 0.1.1 (Darriba et al., 2012). The run was on 1000 bootstraps using the MEGA program version 11 (Tamura et al., 2021). For microsatellite loci, a dendrogram was constructed by the UPGMA in MEGA program version 11, using the Nei genetic distance for each pair of localities, including null allele correction (Chapuis and Estoup, 2007).

#### **4.3.3.1 Congruence between molecular markers**

The topological and genetic congruences were determined by the congruence test between distance matrices (CADM; Campbell et al., 2011). This test evaluated the hypothesis of complete incongruence between the dendrograms constructed with the genetic distances of the three markers, which corresponds to phylogenies with different topologies and very different branch lengths (Campbell et al., 2011). The level of congruence was determined by Kendall's  $W$  statistic, which has values between 0 and 1, with 0 indicating no congruence and 1 indicating complete topological or genetic congruence of the trees. For the topological congruence test, the matrices of paired distances between the pairs of tips of each dendrogram were used, using the lengths of their branches as a reference. These matrices were obtained for each molecular marker from the trees constructed with the  $\Phi_{ST}$  values calculated between pairs of locations. For this, the `cophenetic.phylo` function of the R package Ape (Paradis et al., 2004) was run using the matrix in the Newick format resulting from each dendrogram constructed with the UPGMA clustering method.

Regarding the genetic congruence test, the  $\Phi_{ST}$  matrices of each marker were also used. Finally, the CADM test was run for each congruence type and between pairs of markers with the `CADM.global` function of the R package Ape (Paradis et al., 2004). The significance value of  $p$  was estimated from 9999 permutations. As a complement, the concordance factor (CF) and Euclidean distance (ED) between trees proposed by Kendall et al. (2018) were calculated. These procedures consist of comparing the topology of the trees according to the names of the tip categories. The calculations were performed with the `treeConcordance` function of the R package treeSpace (Jombart et al., 2017), entering the matrix in the Newick format of each dendrogram.

Additionally, the Mantel test was performed between the paired  $\Phi_{ST}$  matrices of the markers. These analyses were performed with the `mantel` function of the R package vegan 2.5.7 (Oksanen et al., 2020). Values of  $r$  tending to 1 and with  $p < 0.05$  indicate congruence between matrices. The significance values were estimated from 99999 permutations.

### 4.3.3.2 Demographic history

The demographic history of *C. pica* was assessed with the COI gene sequences. First, the neutrality tests were performed with Tajima D (Tajima, 1989) and Fu's  $F_s$  (Fu, 1997) using ARLEQUIN V3.5 software (Excoffier and Lischer, 2010). These indices detect deviations from the Wright-Fisher mutation-drift equilibrium based on excess or deficit of low-frequency haplotypes generated by population expansion, bottlenecks, or selection events that have occurred in the past (Excoffier and Lischer, 2010). To evaluate changes in population size by comparing paired differences and expected values under the Rogers and Harpendin (1992) model, a mismatch distribution was performed with the DNASP v.6 software (Rozas et al., 2017). Deviations of the observed mismatch distributions from those expected under a demographic expansion model were tested by the Ramos-Onsins and Rozas's  $R_2$  (Ramos-Onsins and Rozas, 2002) with DNASP v.6 software, and the sum of square deviations (SSD) and Raggedness index ( $rg$ ) with ARLEQUIN V3.5 software. Similarly, to assess changes in population size in the past, a Bayesian Skyline Plot (BSP) analysis based on coalescence (Drummond et al., 2012) was run using the BEAST v2.6.6 software (Bouckaert et al., 2019). The run was performed with 250 million generations and burning of 10%. A relaxed clock log-normal model was implemented with the generalized time reversible (GTR) model of sequence evolution and a correction factor of  $\Gamma=4$ , previously estimated. A conservative divergence rate range for gastropod COI gene sequences was used. It is based on a minimum value of 0.7% and a maximum of 2.4% substitutions per million years, which was implemented for species of the families Trochidae (Hellberg and Vacquier, 1999; Donald et al., 2005) and Turbinidae (Chiu et al., 2013), which are sister families of the Tegulidae to which *C. pica* belongs. BSP was implemented for each clade (clade 1. Cabo de la Vela, and clade 2. Santa Marta, Cartagena, and Capurganá) and for the whole dataset. The graph of the historical change in population size was obtained with Tracer 1.7 software (Rambaut et al., 2018).

## 4.4 Results

### 4.4.1 Genetic and phylogeographic structure

For microsatellite loci, the dataset was consisted of 360 individuals. All loci were polymorphic and the results of the genetic diversity by locus and sampling localities for *C. pica* are presented in **Anexo 4**. Departure from Hardy-Weinberg equilibrium was detected at all loci and localities. However, no linkage disequilibrium was detected. The number of alleles per locus ranged from 5 to 28, with an average number of  $12.4 \pm 4.9$  alleles/locus. The presence of private alleles was observed in all localities, with values that do not exceed three alleles, except in Santa Marta where 34 alleles were detected. The average values of observed and expected heterozygosities were  $H_o = 0.175 \pm 0.115$  and  $H_e = 0.849 \pm 0.072$ , and the fixation index was  $F_{IS} = 0.795 \pm 0.129$  (**Anexo 4**). The diversity indices calculated in each locality showed low values of  $H_o$ , and high values of  $H_e$  and  $F_{IS}$ , with little variation across localities. Cabo de la Vela showed a low value of  $H_o$  (0.122

$\pm 0.058$ ) and high values of  $H_e$  ( $0.796 \pm 0.071$ ) and  $F_{IS}$  ( $0.848 \pm 0.070$ ), while in Santa Marta the opposite was observed ( $H_o = 0.248 \pm 0.114$ ;  $H_e = 0.904 \pm 0.026$ ;  $F_{IS} = 0.726 \pm 0.123$ ) (**Tabla 4-2**).

For the COI gene dataset, the sequence size was 440 bp for 67 samples. Among the samples from the five sites, a total of 29 polymorphic sites and 26 haplotypes were estimated. The average haplotype and nucleotide diversity indices were  $0.777 (\pm 0.161)$  of standard deviation) and  $0.007 (\pm 0.003)$ , respectively. The highest number of haplotypes was determined in Cabo de la Vela (8) and the lowest in Santa Marta (5). Concerning diversity indices, variation was observed among sites, with Cabo de la Vela having the highest values ( $H_d = 0.939 \pm 0.048$ ;  $\Pi = 0.0105 \pm 0.0062$ ) and Santa Marta having the lowest ( $H_d = 0.539 \pm 0.161$ ;  $\Pi = 0.0029 \pm 0.0022$ ) (**Tabla 4-2**).

The results of pairwise  $F_{ST}$  comparison for the three markers showed genetic differences among sites. The Cabo de la Vela samples presented the highest level of genetic differentiation than samples of all other localities ( $F_{STmic} > 0.042$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{STSNP} > 0.130$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{STCOI} > 0.103$ ,  $P < 0.05$ ; **Tabla 4-3**), including Santa Marta, its nearest neighbor ( $F_{STmic} = 0.042$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{STSNP} = 0.175$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{STCOI} = 0.264$ ,  $P < 0.05$ ; **Tabla 4-3**). The samples from Santa Marta showed differentiation from all localities (Cabo de la Vela, Cartagena, Isla Fuerte, and Capurganá:  $F_{ST-mic} > 0.020$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{ST-SNP} > 0.057$ ,  $P < 0.05$ ), except with samples from Cartagena ( $F_{ST-COI} = 0.019$ ,  $P > 0.05$ ) and Capurganá ( $F_{ST-COI} = 0.071$ ,  $P > 0.05$ ) (**Tabla 4-3**) when were analyzed with the COI gene dataset. These results were consistent with the  $\Phi_{ST}$  statistics for all markers (**Tabla 4-3**), including the  $F_{ST}$  values of microsatellite loci that were calculated with excluding null alleles (**Anexo 5**).

The Bayesian analysis with the microsatellite loci dataset revealed variation in the probable number of populations. According to the methods of Evanno et al. (2005), Raj et al. (2014), and Puechmaille (2016),  $K = 5$ ,  $K = 3$ , and  $K = 4$  were the best  $K$ . For the case of the SNPs loci dataset, the methods of Raj et al. (2014) and Puechmaille (2016) agreed on a  $K = 3$ , while that of Evanno et al. (2005) was  $K = 5$ . Despite the abovementioned results, the bar plots of the population ancestry coefficient reveal that the Cabo de la Vela and Santa Marta localities remain differentiated among themselves and the other localities when the value of  $K$  is equal to or greater than three (**Figura 4-2A, C**). The Cartagena, Isla Fuerte, and Capurgana localities share the same cluster at  $K=3$  for microsatellite loci and SNPs loci. However, only with the microsatellite loci dataset, the new clusters are co-distributed among those sites in a greater proportion when  $K = 4$  and  $K = 5$  (**Figura 4-2A, C**). The results of the discriminant analysis of principal components (DAPC) with both datasets of molecular markers were concordant with  $K=3$  of the Bayesian analysis, where Cabo de la Vela differed from Santa Marta and these sites in turn from the rest of the localities (**Figura 4-2B, D**). The samples from Cartagena, Isla Fuerte, and Capurganá are shown in the same lower right quadrant of the discriminant functions 1 and 2 with the SNP loci dataset analysis; while they overlap with the microsatellite loci dataset (**Figura 4-2B, D**).

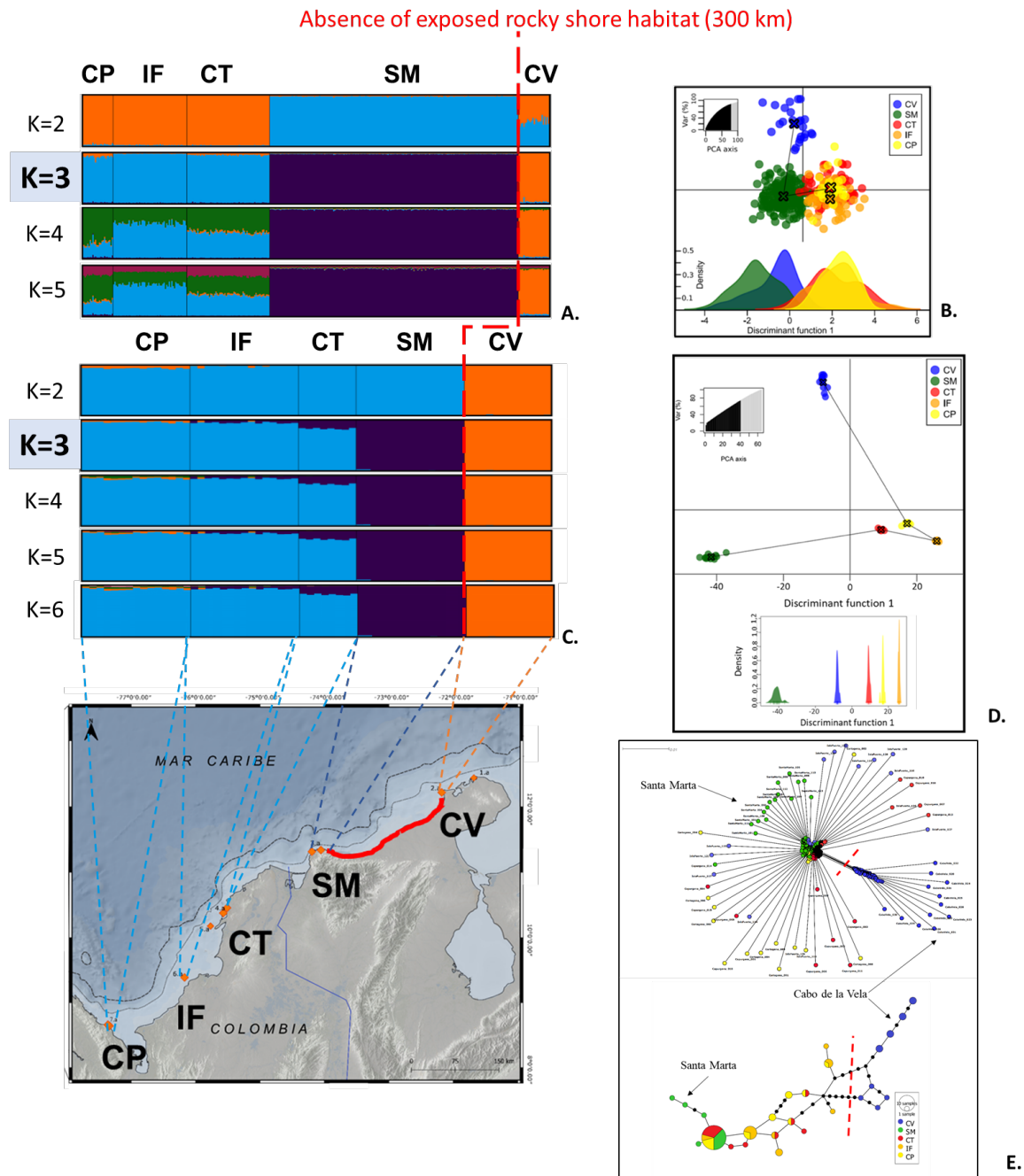


**Tabla 4-2.** Values of genetic diversity indices by molecular marker in the five localities sampled in the southern Caribbean, Colombia sector for *Cittarium pica*.

	Cabo de la Vela			Santa Marta			Cartagena			Isla Fuerte			Capurganá		
<b>Microsatellite loci data (10 loci)</b>															
	<b>Average</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>Average</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>Average</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>Average</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>Average</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>
Sample size	23,9	±	0,3	191,2	±	1,0	63,1	±	1,0	57	±	0	22,7	±	0,9
Number of Alleles	8	±	1,9	17,9	±	5,7	13,3	±	3,9	13,0	±	3,3	9,9	±	2,6
Private alleles	2			34			3			3			1		
Observed Heterozygosity	0,122	±	0,06	0,248	±	0,11	0,147	±	0,11	0,156	±	0,13	0,201	±	0,12
Expected Heterozygosity	0,796	±	0,07	0,904	±	0,03	0,869	±	0,04	0,869	±	0,03	0,809	±	0,11
Fixation Index	0,848	±	0,07	0,726	±	0,12	0,829	±	0,13	0,819	±	0,15	0,751	±	0,14
<b>SNPs data</b>															
Sample size	11,2	±	0,0	14,5	±	0,0	7,4	±	0,0	14,4	±	0,0	14,3	±	0,0
Observed Heterozygosity	0,0008	±	0,0000	0,0010	±	0,0000	0,0011	±	0,0000	0,0011	±	0,0000	0,0011	±	0,0000
Expected Heterozygosity	0,0008	±	0,0000	0,0011	±	0,0000	0,0011	±	0,0000	0,0012	±	0,0000	0,0012	±	0,0000
Nucleotide diversity	0,0009	±	0,0000	0,0011	±	0,0000	0,0012	±	0,0000	0,0012	±	0,0000	0,0012	±	0,0000
Fixation Index	0,0002	±	0,00	0,0003	±	0,00	0,0003	±	0,00	0,0004	±	0,00	0,0004	±	0,00
<b>Mitochondrial COI gen data</b>															
Sample size	12			13			14			14			14		
Number of haplotypes	8			5			7			7			7		
Polymorphic sites	11			5			8			12			9		
Haplotype diversity	0,939	±	0,048	0,538	±	0,161	0,692	±	0,137	0,857	±	0,074	0,857	±	0,074
Nucleotide diversity	0,0105	±	0,0062	0,0029	±	0,0022	0,0047	±	0,0000	0,0090	±	0,0018	0,0076	±	0,0047

**Tabla 4-3.** Pairwise comparison of  $\Phi_{ST}$  between the five localities sampled across the southern Caribbean (Colombia sector) for *Cittarium pica* from the southern Caribbean, Colombia sector. Below and above the diagonal, the  $F_{ST}$  and  $\Phi_{ST}$  values are provided, respectively. All values presented significance level of  $p < 0.005$ , except those indicated with an asterisk.

Localities	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
<b>Microsatellite loci data (10 loci)</b>							<b>SNPs data</b>						<b>COI gen</b>				
1. Cabo de la Vela		0.067	0.070	0.035	0.084			0.175	0.16	0.136	0.13			0.803	0.760	0.653	0.681
2. Santa Marta	0.042		0.036	0.009	0.090		0.133		0.057	0.06	0.063		0.264		0.103	0.318	0.278
3. Cartagena	0.048	0.020		0.055	0.021		0.128	0.054		0.008	0.013		0.187	0.019*		0.130	0.071*
4. Isla Fuerte	0.055	0.021	0.012		0.028		0.106	0.052	0.029		0.007		0.103	0.223	0.152		0.009*
5. Capurganá	0.062	0.036	0.024	0.027			0.101	0.054	0.031	0.022			0.103	0.071*	0.014*	0.034*	



**Figure 4-2.** Bar graphs of the population ancestry coefficient from Structure's analysis indicating the distribution of the number of K probable populations (A: microsatellite loci; C: SNP loci); Discriminant analysis of principal components (B: microsatellite loci; D: SNP loci) among the samples from the five localities analyzed for *Cittarium pica* in the Southern Caribbean, Colombia sector. Map of the study area, indicating the five sampling localities. CV: Cabo de la Vela, SM: Santa Marta, CT: Cartagena, IF: Isla Fuerte, CP: Capurganá. Gray arrow: Caribbean Current; black arrow: Caribbean Counter Current. Scheme of currents based on Andrade (2015) and Correa-Ramírez et al. (2020). The red line indicates the putative barrier: the combination of the absence of shallow rocky bottoms and the almost permanent upwelling in La Guajira (ARB+PUG). (E) phylogenetic tree network constructed with the SNP data set (top) and COI gene haplotype

network (bottom), among the samples from the five localities analyzed for *Cittarium pica* in the Southern Caribbean, Colombia sector. The red line on the map indicates the putative barrier.

#### 4.4.2 Phylogeographic break

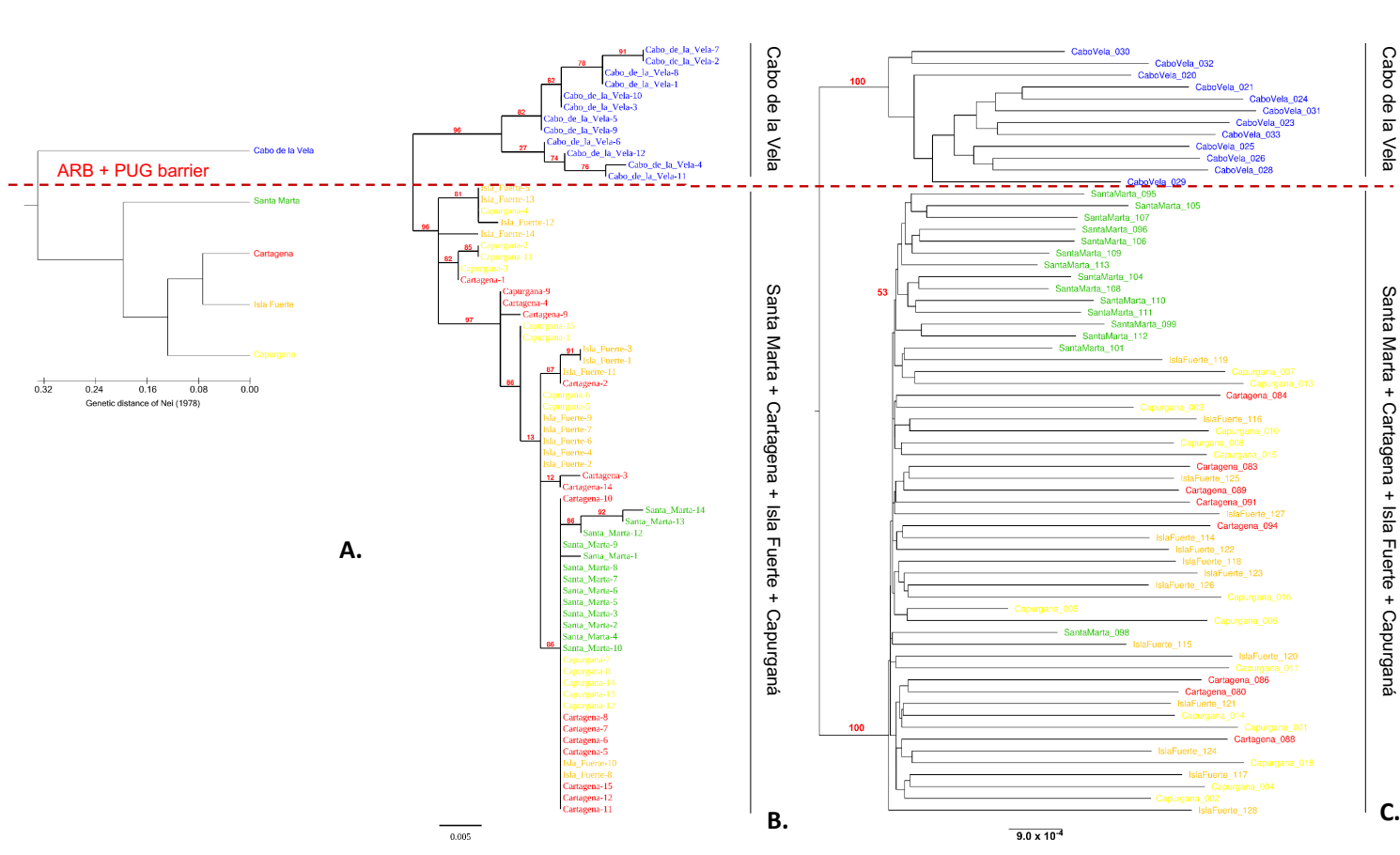
The maximum-likelihood trees of the mitochondrial COI gene (Log-likelihood = -877.44120) and SNP loci (Log-likelihood = -55078.538) revealed phylogeographic structure, showing the existence of a break between two clusters. The first was established by the samples from Cabo de la Vela, and the second by those from Santa Marta, Cartagena, Isla Fuerte, and Capurganá (**Figura 4-3**). Similarly, the network tree with the SNP loci dataset and the haplotype network of the COI gene dataset showed two clusters (**Figura 4-2E**). The AMOVA performed for the three datasets of molecular markers indicated that *C. pica* does not exhibit a panmictic population among the sites (**Tabla 4-4**). For all three datasets, the highest level of genetic differentiation was observed when evaluating the effect of the absence of the exposed rocky coastline between Cabo de la Vela and Santa Marta ( $\Phi_{CT-mic} = 0.038$ ,  $p < 0.05$ ;  $\Phi_{CT-SNP} = 0.224$ ,  $p < 0.05$ ;  $\Phi_{CT-COI} = 0.722$ ,  $p < 0.05$ ). Genetic differences were also observed when  $K = 3$  was assumed ( $\Phi_{CT-mic} = 0.030$ ,  $p < 0.05$ ;  $\Phi_{CT-SNP} = 0.174$ ,  $p < 0.05$ ;  $\Phi_{CT-COI} = 0.619$ ,  $p < 0.05$ ). The effect of the Plume of the Magdalena River showed low but significant genetic differentiation among the two groups of localities ( $\Phi_{CT-mic} = 0.012$ ,  $p < 0.05$ ;  $\Phi_{CT-SNP} = 0.076$ ,  $p < 0.05$ ), except for with the COI gene dataset ( $\Phi_{CT-COI} = 0.019$ ,  $p > 0.05$ ; **Tabla 4-4**). The above explains why the Mantel test showed that the relationships between geographic and genetic distances for the three markers do not fit the isolation by distance model ( $r_m$  microsatellite = 0.45,  $p = 0.185$ ;  $r_m$  SNPs = 0.44,  $p = 0.212$ ;  $r_m$  COI = 0.51,  $p = 0.134$ ).

#### 4.4.1 Congruence between molecular markers

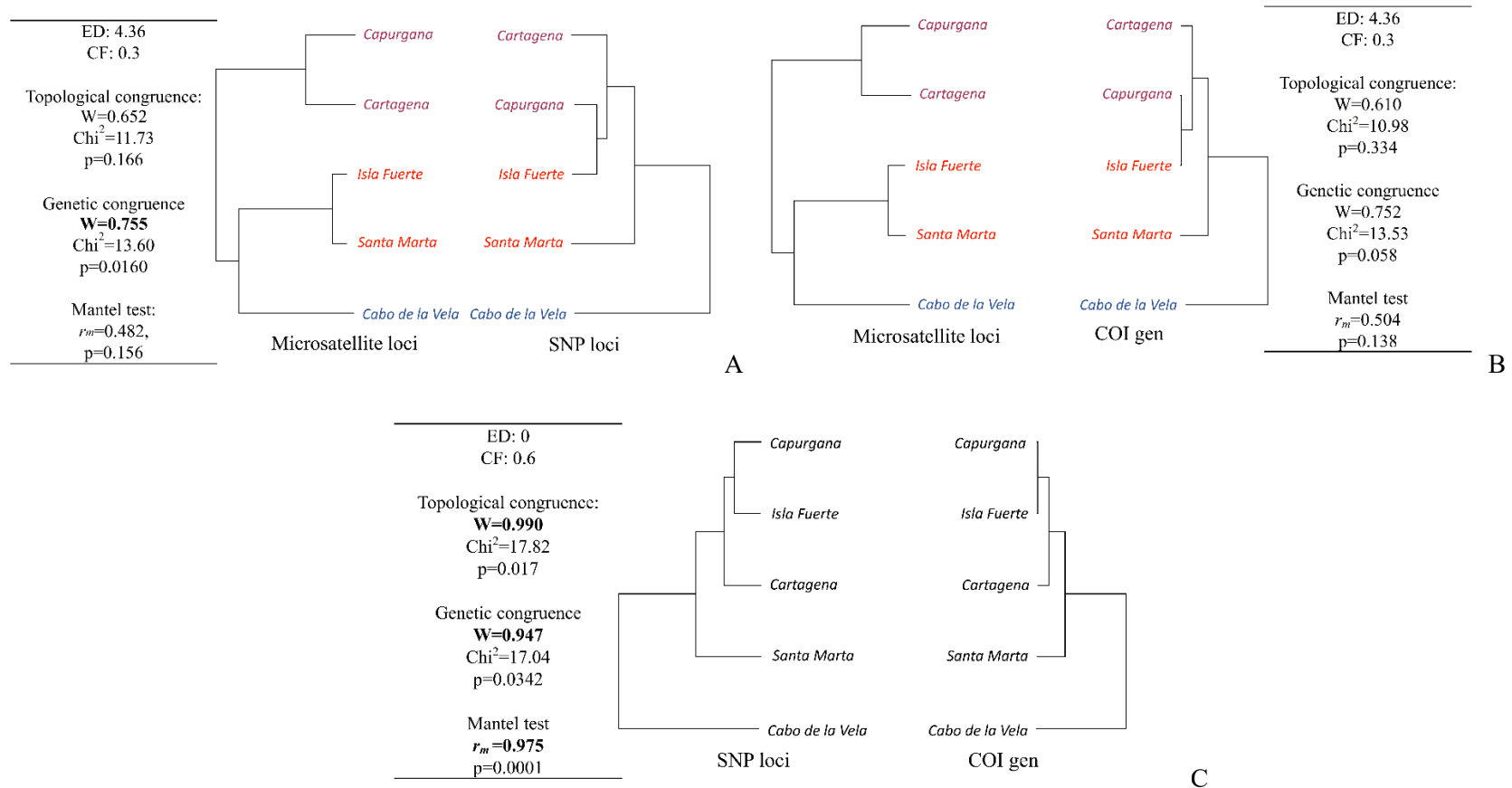
The global CADM test warranted rejecting the hypothesis of topological incongruence ( $W = 0.667$ ,  $X^2 = 10.02$ ,  $p = 0.014$ ) and genetic incongruence ( $W = 0.757$ ,  $X^2 = 20.44$ ,  $p = 0.002$ ) for the three molecular markers. Among the marker pair comparisons, only the SNP loci and COI gene exhibited high and significant topological ( $W = 0.990$ ,  $X^2 = 17.82$ ,  $p = 0.017$ ) and genetic congruence ( $W = 0.947$ ,  $X^2 = 17.04$ ,  $p = 0.0342$ ). The SNPs loci and the COI gene also showed the highest similarity of the dendrograms (Euclidean distance = 0), a relatively high concordance in the location of category names in the dendrograms (Factor Concordance = 0.6), and a high correlation between the  $\Phi_{ST}$ -based distance matrices ( $r_m = 0.975$ ,  $p = 0.0001$ ) (**Figura 4-4**).

**Tabla 4-4.** Hierarchical AMOVA evaluating the effect of two putative barriers for *Cittarium pica* from the five localities sampled in the Southern Caribbean. Colombia sector. Statistic values assessed the level of differentiation between groups ( $\Phi_{CT}$ ), within localities within each group ( $\Phi_{SC}$ ) and between all localities ( $\Phi_{ST}$ ); the percentage of variation for each source of comparison is indicated; \* significance level  $p > 0.05$ . K is the most likely population quantity based on Bayesian analysis. \*\* Fst value of microsatellite loci was calculated by excluding null alleles (Chapuis and Estoup, 2007).

Source of variation	Microsatellite loci		SNPs loci		Mitochondrial COI gen	
	Fixation Indices	% of variation	Fixation Indices	% of variation	Fixation Indices	% of variation
<b>Panmictic population (without grouping)</b>						
Among groups ( $\Phi_{CT}$ )		4.0		21.3		55.73
Among individuals within groups ( $\Phi_{SC}$ )						
Within individuals ( $\Phi_{ST}$ )	0.042 (0.025**)	96.0	0.214	78.7	0.557	44.27
<b>Effect of absence of rocky shore habitats along the 300 km of coastline and the almost permanent upwelling in The Guajira peninsula (Group 1. CV Vs. Group 2. SM+CT+IF+CP)</b>						
Among groups ( $\Phi_{CT}$ )	0.038	3.8	0.224	22.4	0.722	72.22
Among individuals within groups ( $\Phi_{SC}$ )	0.034	3.3	0.120	9.4	0.134	3.73
Within individuals ( $\Phi_{ST}$ )	0.071	92.9	0.318	68.2	0.759	24.06
<b>Effect of the Magdalena River Plume (Group 1. CV+SM Vs. Group 2. CT+IF+CP)</b>						
Among groups ( $\Phi_{CT}$ )	0.012	1.2	0.076	7.6	-0.019*	1.94
Among individuals within groups ( $\Phi_{SC}$ )	0.033	3.3	0.159	14.7	0.552	54.15
Within individuals ( $\Phi_{ST}$ )	0.045	95.5	0.223	77.7	0.561	43.91
<b>Grouping based on K=3 (Group 1. CV Vs. Group 2. SM Vs. Group 3. CT+IF+CP)</b>						
Among groups ( $\Phi_{CT}$ )	0.030	3.0	0.174	17.4	0.619	61.94
Among individuals within groups ( $\Phi_{SC}$ )	0.016	1.6	0.093	7.7	0.073*	2.78
Within individuals ( $\Phi_{ST}$ )	0.046	95.4	0.251	74.9	0.647	35.28



**Figura 4-3.** Dendrogram constructed with the genetic distance of Nei (1978) from the ten species-specific microsatellite loci and using the UPGM clustering method (A); ML phylogenetic trees constructed with the mtDNA COI gene (B) and the SNP dataset (C) for *C. pica* in the Southern Caribbean, Colombia sector. The red line indicates the barrier: the combination of the absence of a rocky bottom and the almost permanent upwelling in The Guajira peninsula (ARB+PUG). The tips with colors indicate blue for Cabo de la Vela, green for Santa Marta, red for Cartagena, orange for Isla Fuerte, and yellow for Capurganá.



**Figura 4-4.** Analysis of genetic and topological congruence between Microsatellite loci, SNP loci and COI gene markers was performed using the CADM test (Campbell et al., 2011), and the concordance factor (CF) and Euclidean distance (DE) were determined using the algorithms of Kendall et al. (2018). Dendrograms were constructed with the  $\Phi_{ST}$  values using the UPGMA clustering method and relating the localities sampled for *C. pica* in the Southern Caribbean, Colombia sector.  $W$  = Kendall statistic;  $r_m$  = Mantel correlation coefficient;  $p$  = significance value.

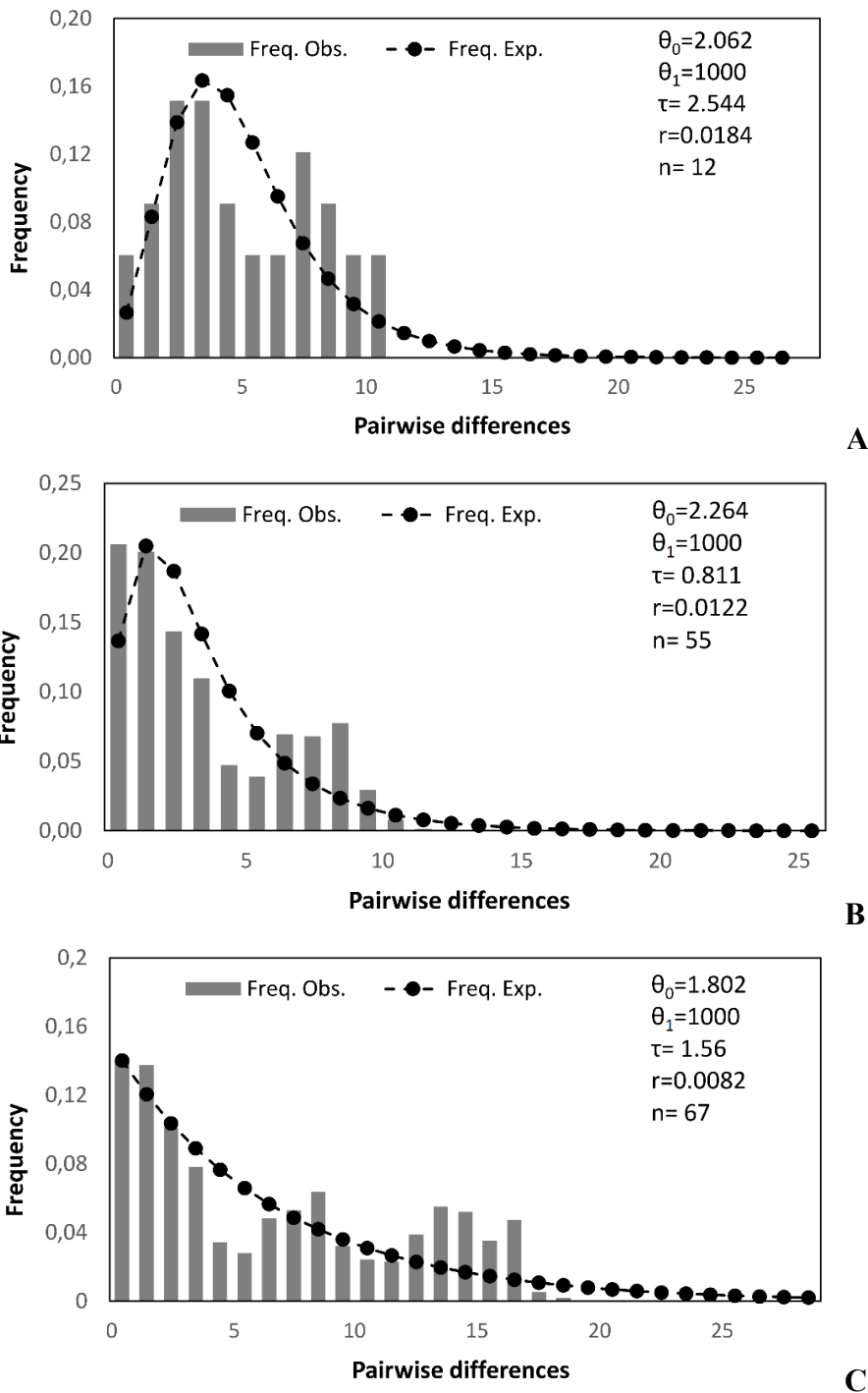
#### 4.4.2 Demographic history

The results of the demographic history analysis showed that Tajima's  $D$  values were negative and not significant in Santa Marta+Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá (Clade 2), and the whole dataset, respectively (**Tabla 4-5**). Fu's  $F_S$  test revealed that all values were negative and not significant, except for clade 2 and the whole dataset, indicating a recent population expansion. The mismatch distributions analysis for the two clades and for the whole dataset showed that the distribution of paired differences observed between sequences did not deviate from those expected under a demographic expansion model (**Figure 4-5**). These analyses were supported by the SSD,  $R_2$ , and  $rg$  statistics, which were not significant (**Tabla 4-5**). However, the individual analysis of SSD showed a significant value for Santa Marta. Under the proposed range of 0.7 to 2.4% substitutions per million years, the Bayesian Skyline Plots (BSP) showed an increase in the population size for the whole dataset taking place at 120,000 years before present, with the increase becoming more marked over the last 60,000 years. In Clade 2, the change occurred within the last 60,000 years before the present (**Figure 4-6**).

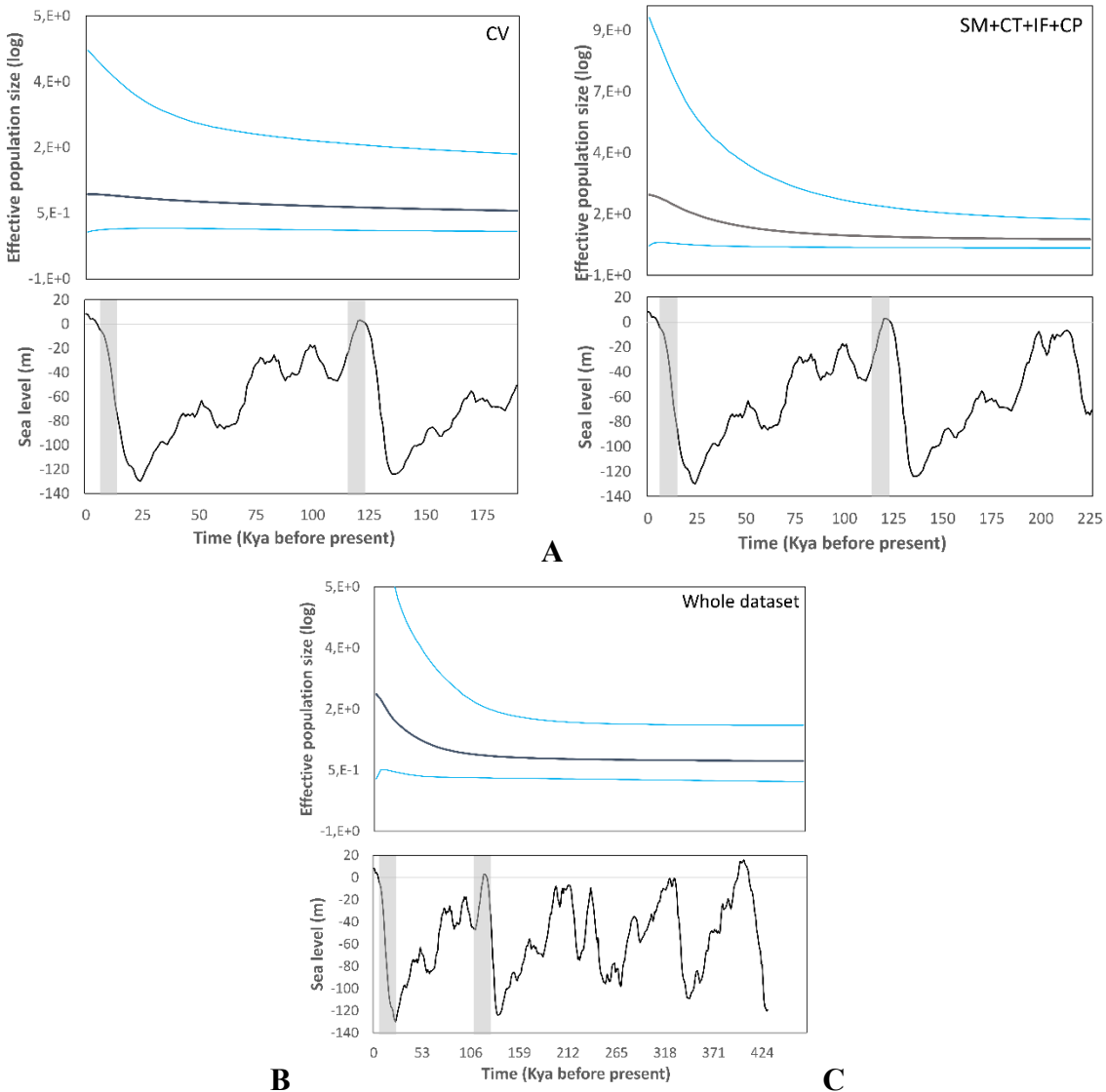
**Tabla 4-5.** Demographic history indices for *Cittarium pica* from the Southern Caribbean, Colombia sector. SSD= sum of squares deviations;  $R_2$ =Ramos-Onsins and Rozas test;  $rg$ = mismatch distribution Raggedness index. Values in bold indicate p-value < 0.05. \* Significance level  $p > 0.05$ .

Localities/Clade	Tajima's $D$	Fu's $F_S$	SSD	$rg$	$R_2$
Cabo de la Vela (Clade 1)	1.10061*	- 1.27689*	0.00962*	0.01837*	0.2094*
Santa Marta	-0.78512*	- 1.18819*	<b>0.38297</b>	0.119*	0.1192*
Cartagena	-0.6576*	- 1.95731*	0.03465*	0.11520*	0.1595*
Isla Fuerte	0.21593*	- 0.11396*	0.05843*	0.08755*	0.155*
Capurganá	0.72217*	- 0.57292*	0.0119*	0.02476*	0.1803*
Clade 2 (Santa Marta+Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá)	-0.6771*	<b>-6.5550</b>	0.00613*	0.0122*	0.0882*
Whole dataset	-0.07516*	<b>-6.649</b>	0.10679*	0.0082*	0.1047*





**Figura 4-5.** Plots of the paired difference distribution model for the sequences of a 440 bp segment of the COI gene for *Citarium pica* in the Southern Caribbean, Colombia sector, provided by the Mismatch distributions analysis. A. Clade 1: Cabo de la Vela; B. Clade 2: Santa Marta+Cartagena+Capurganá; C. whole dataset. n is the number of sequences;  $\theta_0$  and  $\theta_1$  are population size before and after expansion, respectively; r is the Raggedness statistic.



**Figura 4-6.** *Cittarium pica* demographic history from the Southern Caribbean, Colombia sector, estimated by Bayesian Skyline Plots (BSP) for (A) clade 1: Cabo de la Vela, (B) clade 2: Santa Marta+Cartagena+Capurganá, and (C) the entire COI gene dataset. The dark black solid line represents the median effective population size estimates over time, and the light blue line indicates the upper and lower 95% confidence limits. The effective population size ( $N_e$ ) is estimated as the log effective population size multiplied by generation time. The graphs below depict the simulated projection of historical sea level change over the last 430 thousand years (Spratt and Lisiecki, 2016). The vertical bands indicate the range of the last glacial period.

## 4.1 Discussion

### 4.1.1 Genetic and phylogeographic structure

The comparative analysis of the molecular markers microsatellite loci, SNPs loci, and the COI gene showed contrasting results in the genetic diversity of *Cittarium pica* in the southern Caribbean, Colombia sector. This is expected when it is known that, according to their nature, molecular markers can present different levels of variability. Microsatellite loci and SNPs are diploid, while mitochondrial loci are haploid. Microsatellite loci are polymorphic and can exhibit high diversity. In contrast, SNPs do not due to their four possible allelic states and low mutation rate (Reitzel et al., 2013). The values provided by microsatellites were very low ( $H_o = 0.122 - 0.248$ ) compared to other Caribbean and Pacific marine invertebrate species ( $H_o > 0.4$ ; Karl and Hayes, 2012; Porto-Hannes et al., 2014; Valle et al., 2015; Rippe et al., 2017; Benavides, 2020; Alegría-Ortega et al., 2020; Quintero-Galvis et al., 2020). However, they were similar to other species studied in the southern Caribbean (Ospina-Guerrero et al., 2008; Landínez-García et al., 2009; Mendoza-Ureche et al., 2019; Atencia et al., 2021).

Hardy-Weinberg disequilibrium analysis indicated that *C. pica* showed a deficit of heterozygotes at all loci, which coincides with the high values of the inbreeding index ( $F_{IS} = 0.726-848$ ). The effect of the presence of null alleles, which were detected at a high percentage in all microsatellite loci, is not unknown (**Anexo 6**). The magnitudes of genetic diversity values of SNPs loci were low and are concordant with the literature discussion on the limitation of these markers for measuring genetic diversity (McCormack et al., 2013; Reitzel et al., 2013). However, SNPs loci are relevant in studies of genetic structure and phylogeography (Fischer et al., 2017; Leaché and Oaks, 2017; Sunde et al., 2020), as in this case. The COI gene of *C. pica* revealed variation in haplotype ( $H_d = 0.538-0.939$ ) and nucleotide diversity ( $\Pi = 0.0029-0.0105$ ) values. These values were high in Cabo de la Vela and low in Santa Marta samples. Nevertheless, the levels of COI gene diversity indices were similar to those documented for *C. pica* populations from other Caribbean regions (Díaz-Ferguson et al., 2010). They were also similar to those of other marine invertebrate species studied in various regions of the world (Crandall et al., 2008; Díaz-Ferguson et al., 2012; Crandall et al., 2014; Mattos et al., 2019; Stark et al., 2021; Villamor et al., 2021).

Generally, low levels of genetic diversity were found with microsatellite loci and COI gene; these low values are of concern. A combination of historical (discussed below) and contemporary events are plausible causes. Habitat availability, overfishing, and the reproductive biology of *C. pica* could be the factors contributing to the observed results. The concern is greater in those sites where *C. pica* has reduced habitat availability, low population density values, and a strong presence of fishermen. This has been demonstrated in Santa Marta (Daza et al., 2018), Cartagena, Isla Fuerte, and Capurganá (Osorno and Díaz, 2006). In addition, *C. pica* has a lifespan of five to seven years and a PLD of less than six days (Velasco and Barros, 2017), providing an opportunity for local

populations to present reproductive selection and high retention of the same alleles/haplotypes. Given its longevity, *C. pica* has a continuous reproductive pattern in which the same female can reproduce several times during her lifetime (Blanco, 2016).

These characteristics are also part of the explanations for the genetic structure of *C. pica*, for which a high level of genetic substructuring was determined. Three genetic clusters were identified along the Southern Caribbean using Bayesian analysis, PCA, and AMOVA (assuming  $K = 3$ ). The delimitations of these populations are under the influence of the putative barriers evaluated. The first population was located at Cabo de la Vela and the second at Santa Marta; both populations were separated by the barrier that was defined as a combined effect of the absence of the rocky bottom at a distance greater than 300 km from the coastal edge and the area of the almost permanent Guajira upwelling (ARS + PUG hereafter; AMOVA:  $\Phi_{CT} = 0.224$ ,  $p < 0.05$ ). The phylogenetic analysis confirmed a break between Cabo de la Vela and Santa Marta. For instance, SNPs and mitochondrial molecular markers revealed two well-supported clades with ML and network trees, which are separated by the ARB + PUG barrier. Clade 1 includes Cabo de la Vela samples, and Clade 2 those Santa Marta+Cartagena+Isla Fuerte+Capurganá. Moreover, congruence analysis showed that these marker datasets had 66% topological concordance, high topological similarity, and significant genetic congruence. The Mantel test also showed a high and significant correlation between the genetic distance matrices based on the  $\Phi_{ST}$  statistic.

The third population was located from Cartagena to Capurganá, apparently bounded by the Magdalena River plume (MRP), but it was not confirmed as a barrier. The Caribbean Counter Current (CCC) is responsible for keeping the third population homogeneous. This current derives from the Panama-Colombia Gyre (Andrade, 2001; Correa-Ramirez et al., 2020), and during the weakening of the North Trade Winds the current influences the transport of a mass of water from the southwestern Colombian Caribbean to the area off Cabo de la Vela (Andrade, 2001; Bernal et al., 2006; Orfila et al., 2021). Other studies that rejected the MRP hypothesis as a biogeographic barrier proposed the CCC as an oceanographic factor that facilitates the exchange of genetic information between populations of various marine species that are not significantly structured throughout the southern Caribbean (*Stegaster partitus*, Ospina-Guerrero et al., 2008; *Caranx hippos*, Caiafa et al., 2018; *Orbicella faveolata*, Alegría-Ortega et al., 2021; *Sparisoma aurofrenatum*, Velasco-Montoya et al., 2022; *Mugil liza*, Aguirre et al., 2022; *Acropora cervicornis* and *A. palmata*, García et al. 2022; *Nerita tessellata*, Quintero-Galvis et al. (in press).

Research suggests that species with larvae capable of long-distance dispersion tend to have lower genetic differentiation than those with shorter larval periods (Arndt and Smith, 1998; Cowen, 2002; Hellberg et al., 2002; Kinlan and Gaines, 2003; Kelly and Palumbi, 2010; Haye et al., 2014; Modica et al., 2017). Therefore, barriers restricting gene movement can increase genetic differentiation (Kelly and Palumbi, 2010; Teske et al., 2016; Mattos et al., 2019). It is important to note that not all larvae have high dispersal

potential. Habitat fragmentation, historical events, current patterns, and ecological conditions by rainfall discharges and upwelling events must be considered in order to interpret the level of genetic structure in a population (Kyle and Boulding, 2000; Hellberg et al., 2002; Siegel et al., 2003; Sotka et al., 2004; Cowen et al., 2006; Betancur et al., 2010; Kelly and Palumbi, 2010). The case of *C. pica* provides evidence of a phylogeographic break in the southern Caribbean caused by the absence of rocky bottoms (ARB). The break is located between Cabo de la Vela and TNNP (at Santa Marta) at a coastline distance of over 300 km. It coincides with the almost permanent upwelling of The Guajira peninsula (PUG). The PUG experiences a strong upwelling from December to May due to high-intensity trade winds and it coincides when *C. pica* exhibits the first reproductive peak in Santa Marta (Osorno et al., 2009). Within this period, the upwelling zone generates a displacement of upwelled water masses from the coastline to the sea by surface currents to the west (Gómez and Acero, 2020; Orfila et al., 2021), limiting the movement of larvae from the southwestern to the northeast Caribbean coast of Colombia (Andrade, 2015). The second peak occurs between August and October and aligns with the maximum speed of CCC currents, approximately 0.4 m/sec (Correa-Ramírez et al., 2020). Suppose *C. pica* larvae are released in Santa Marta during this period, they will take over eight days to reach Cabo de la Vela, so their settlement would not be achieved because their PLD. Therefore, we propose that the ARB and PUG have a combined effect in generating phylogeographic breaks in *C. pica* populations.

On the other hand, during the Caribbean storm and hurricane season (June-November), the oceanographic conditions described above may be altered and affect the gene flow between Santa Marta and Cabo de la Vela. However, the Colombian Caribbean is not considered a potentially vulnerable zone, and although only a few tropical storms and hurricanes have impacted its coast (see Ortíz, 2012), they could not significantly alter the genetic structure of *C. pica* populations.

The hypothesis of the existence of PUG barrier was proposed in the past with simulation data (Cowen et al., 2006). However, experimental studies have rejected the hypothesis, given that species associated with the rocky bottoms and coral reefs have a high potential for dispersal (*E. lucunter lucunter*, Benavides, 2020; *N. tessellata*, Quintero-Galvis et al., in press) or did not include samples from The Guajira peninsula (*S. aurofrenatum*, Velasco-Montoya et al., 2022; *Acropora cervicornis*, *A. palmata*, García-Urueña et al., 2022; *Madracis auretenra*, Ballesteros-Contreras et al., 2022). In this study, SNPs and mitochondrial molecular markers revealed two well-supported clades, which are separated by the ARB+PUG barrier. Moreover, congruence analysis showed that these marker datasets had 66% topological concordance, high topological similarity, and significant genetic congruence. The Mantel test also showed a high and significant correlation between the genetic distance matrices based on the  $\Phi_{ST}$  statistic.

This phylogeographic break was also determined for the reef species *Acanthemblemaria rivasi* by means of SNP loci (Narváez-Barandica et al., 2023). Samples from Cabo de la Vela also had a high level of genetic differentiation from those from the TNNP (at Santa Marta). Interestingly, *A. rivasi* has a PLD of 22 to 25 days, which could imply that this

range represents a sufficient amount of time for its larvae to disperse beyond the barrier. However, Narváez-Barandica et al. (2023) suggested that characteristics such as parental care of eggs by males, low fecundity, and larval retention near reefs make the species susceptible to the barrier. Added to this is the absence of its specific habitat, which are invertebrate skeleton holes that are embedded in rocks or corals in shallow environments between Cabo de la Vela and TNNP. These authors conclude that the sum of all these factors contributes to the phylogeographic break for *A. rivasi* in the Southern Caribbean.

*Cittarium pica* and *A. rivasi* are susceptible to the ARS+PUG barrier, but they have contrasting larval life histories, as well as distinct biological and ecological characteristics. (Narváez-Barandica et al., 2023). A similar situation occurs in southeastern Australia, where three species associated with the rocky shore show a break in genetic connectivity due to the existence of a biogeographic barrier configured by more than 300 km of sandy shore (Ayre et al., 2009). This physical structure is correlated with the larval life history to explain the phylogeographic pattern of the chiton *Plaxiphora albida*, the barnacle *Catomerus polymerus*, and the limpet *Cellana tramoserica*. The latter two species have a PLD of 16 days and 48 h, respectively (Ayre et al., 2009).

There is also evidence of how upwelling zones affect the genetic and phylogeographic structure of marine species. For example, upwelling at Cape Blanco (Oregon) and Cape Mendocino (California) affects the genetic structure of the barnacle *Balanus glandula* (Sotka et al., 2004) and five species of rocky intertidal community (Kelly and Palumbi, 2010), respectively. Along the southeastern Pacific coast, the gastropod *Crepidatella dilatata* (Brante et al., 2012) and the beach isopod *Excirolana hirsuticauda* (Haye et al., 2019) exhibit a break at 32°S with upwelling as the dominant feature; the fish *Pomatomus saltatrix* exhibits it in the Benguela current upwelling zone (Reid et al., 2016); and the fish *Sebastes thompsoni* between two sectors of the East Sea, which may be related to current patterns such as eddies and upwelling (Yu and Kim, 2018). The above demonstrates the importance of continuing to investigate the effects of the ARB + PUG barrier on other species that inhabit the rocky shores and coral reefs of the Southern Caribbean. Taking into account the Aspect III multispecies approach, it is necessary to test whether the effects of this barrier are generalized throughout the marine community associated with these ecosystems (Avice, 2009).

#### 4.1.2 Demographic history

According to the COI gene analysis, a recent population expansion was determined in the female population of *C. pica* from Clade 2 and whole dataset. This was confirmed by the significant Fu's  $F_s$  statistic in both datasets. Additionally, the mismatch distributions analysis for the two clades and the complete dataset showed a unimodal trend in the distribution of haplotype frequencies; apparently, this is further evidence that a population expansion has occurred. Unimodal distributions are formed by the accumulation of

mutations with minimal loss of lineage and indicate a population expansion (Grant and Bowen, 1998; Cassone and Boulding, 2006). The deviation from the neutral model (by Fu's  $F_s$ ) and the unimodal distribution of the sequences in mismatch distribution could be the result of population recovery events (processes of expansion) after a bottleneck during glaciation periods. According to BSP, *C. pica* had a stable effective population size ( $N_e$ ) over a long period of time, but changed from 120,000 years BP, which coincided with the last glaciation period. This change also occurred in clade 2 from 60,000 years BP. Cabo de la Vela did not show a change in its  $N_e$ .

The glacial period was characterized by significant variations in sea level and temperature. According to Elderfield et al. (2012), the fluctuation in the sea level occurred approximately every 41 kyr before the Middle-Pleistocene transition (900 ka) and every 100 kyr since. Several studies suggest that sea levels fluctuate along coastlines by 115–130 m below current levels (Bintanja et al., 2005; Bintanja and van de Wal, 2008; Clark et al., 2009; Carpenter et al., 2011) and with a horizontal displacement of the shoreline of 10 to 100 km (Jackson 1992; Greenstein et al. 1998). These variations were accompanied by fluctuations in the sea surface temperature of an average of between 1 °C and 3 °C during glacial and interglacial periods (Herbert et al., 2010). The effect of this phenomenon reduced the available coastal habitat for near-shore species and seriously affected connections between both marine regions and populations (Ludt and Rocha, 2015). This meant that shallow marine taxa became restricted to increasingly narrow coastal margins as 92% of the modern habitable shelf became exposed (Ludt and Rocha, 2015), causing bottleneck effects on many populations.

Under this scenario and regarding the results of *C. pica*, significant reduction in the populations is expected (bottleneck) because of fluctuations of more than 100 m in sea level, leaving the coastal line (rocky shoreline) exposed, with a subsequent recovery of the population as the sea returns to optimal levels in which the availability of habitat (rocky shoreline) was suitable. During the expansion process and assuming a constant mutation rate, many haplotypes appear due to the colonization of new environments, and the ancestral haplotypes tend to be more frequent. This situation could explain the high haplotype diversity and the low nucleotide diversity found in *C. pica*, which is due to a low rate of accumulated mutation. This result may be related to a recent colonization of the native range or a bottleneck experienced during recent history (Song et al., 2013).

### 4.1.3 Considerations for the conservation of *C. pica*

Fishery resources, such as *Cittarium pica*, face multiple factors affecting their sustainability. Overfishing is the main factor changing the population dynamics, mainly causing a decrease in abundance and genetic diversity. *C. pica* is easily fished due to its low mobility and presence in the intertidal zone of the rocky shore. In addition, its reduced habitat availability (2 to 40 km of coastline) and the high presence of fishers (1 to 6 fisherman km<sup>-1</sup>) have resulted in low population density values (1.65 to 5.43 individuals m<sup>-2</sup>) (Osorno and Díaz, 2006). This situation probably explains the low genetic diversity

values observed with microsatellite loci. Other fishery resources in the southern Caribbean also present the same situation as *C. pica*. Decreasing landed catches of other species in the southern Caribbean are also correlated with low genetic diversity values (Landínez-García et al., 2009; Mendoza-Ureche et al., 2019; Atencia et al., 2021; Aguirre et al., 2022).

The significant decrease in abundance and genetic diversity for *C. pica* suggests that conservation and management measures have not been sufficiently effective in improving the condition of populations in Colombia. This study demonstrated that *C. pica* presents high levels of genetic substructuring, exhibiting three well-differentiated populations in the southern Caribbean sector of Colombia. This spatial pattern coincides with three of the five zoogeographic subareas proposed by Diaz (1995), who investigated the biogeography of marine gastropods in the southern Caribbean. These subareas are Goajira (Cabo de la Vela), Samarian (Santa Marta-TNNP) and Isthmian (Cartagena, Isla Fuerte and Capurganá). The physical, chemical, and geological conditions of the three subareas have an important effect on the coastal marine species of the Caribbean of Colombia (Narváez-Barandica et al., 2023). Thus, we suggest that each population is proposed as a genetic management unit (GMU; Palsbøll et al., 2007). The GMUs are a tool that facilitates the implementation of strategies for the conservation of species. In this case, because *C. pica* is a fishery resource, each GMU should be declared a fishery management unit by the national fishery authority. A series of strategies should be designed for these units to improve the population status of *C. pica*. For example, the national fisheries authority is recommended to exercise greater control of fishing efforts in the five localities, with greater attention to Santa Marta (Daza et al., 2018). This locality has six fishers per kilometer, mainly in the protected area of TNNP, where fishing should not take place (Osorno and Diaz, 2006). Another recommendation is to promote a fishing closure during the spawning season (August to October; Osorno et al., 2009) to help increase biological recruitment and promote an increase in population density. Finally, a molecular marker-assisted restocking programs should be established to achieve this last aim. Combining the culture protocol proposed by Velasco and Barros (2017) and Velasco et al. (2019) and the use of species-specific microsatellite loci implemented in this study would make it possible to generate a conservation program based on restocking and avoid the loss of genetic diversity of *C. pica*.

#### 4.1.4 Conclusions

A phylogeographic break is revealed in Colombia southern Caribbean sector by analyzing the genetic and phylogeographic structures of the West Indian top shell, *Cittarium pica*. This species showed a high genetic structure with three genetic populations from microsatellite loci and SNPs. The study revealed low levels of genetic diversity and high levels of inbreeding, possibly caused by overfishing, which could be affecting the recruitment rate. In addition, a possible deficit of heterozygotes is due to null alleles at microsatellite loci. Both SNPs loci and COI gene sequences were congruent in exhibiting



a phylogeographic structure. Two clades were identified and are separated by the biogeographic barrier, which is the combination of the absence of specific habitat (rocky shore) on 300 km of coastline and the almost permanent upwelling in the Guajira peninsula (ARB+PUG). In contrast, MRP was found to be a permeable barrier to gene flow.

The demographic history indicates that *C. pica* has undergone a recent expansion process and experienced historical changes in population size in the southern Caribbean, principally in clade two, which includes the localities of Santa Marta, Cartagena, Isla Fuerte, and Capurganá. The above demonstrates the importance of continuing to investigate the effects of the ARB+PUG barrier on other species that inhabit the rocky shores and reefs of the southern Caribbean. It is necessary to test whether the effects of this barrier are generalized throughout the marine community associated with these ecosystems. These results also have relevance for the management and conservation of *C. pica* in the southern Caribbean sector of Colombia. It is suggested that each population be declared a fishing management unit. With this suggestion, the national fisheries authority should: 1. have greater control of the effort to reduce the number of fishers in each locality; 2. consider the temporary closure of fishing activities, mainly during reproduction events; and 3. consider a molecular marker-assisted restocking. Finally, the genetic status observed suggests maintaining *C. pica* in the Colombian red book of marine invertebrates in the vulnerable threat category.



## 5. Exploring genetic patterns and life history traits of marine species in the Colombian Caribbean: insights and limitations<sup>3</sup>

### 5.1 Abstract

This study presents a comprehensive analysis of the life history and genetic structure of fifteen marine species inhabiting the Colombian Caribbean, spanning from La Guajira to the bordering Panama. The species encompass fishes, mollusks, crustaceans, echinoderms, and sharks, occupying rocky substrates, sandy and mixed bottoms, lagoons, and estuaries. Reproductive strategies vary from external to internal fertilization, with unique behaviors such as male oral incubation, egg parental care, and female-mediated embryogenesis. Genetic structure assessment employed microsatellite loci, mitochondrial DNA control region, and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Fixation Index ( $F_{ST}$ ) values exhibited moderate genetic differentiation, with vertebrate species showing higher substructuring than invertebrates. Dispersal potential and fecundity contributed to differing levels of genetic structuring, with low dispersal and fecundity species demonstrating greater differentiation. Different population numbers emerged (1 to 3), influenced by migratory behaviors, ocean currents, and biogeographic barriers. Notably, the study investigated the relationship between Pelagic Larval Duration (PLD) and genetic structuring using linear regression analyses. Positive and moderate associations were observed between PLD and  $F_{ST}$ , while the relationship with the number of populations ( $K$ ) was higher. Species lacking pelagic larvae exhibited weaker correlations. This research emphasizes the importance of considering various PLD metrics and molecular markers in predicting genetic structure. Furthermore, the study identifies four biogeographic barriers impacting genetic discontinuities in four species, driven by habitat availability, oceanographic phenomena, and geomorphological features.

---

<sup>3</sup> Este capítulo fue sometido a la revista *Diversity and Distributions*: **Narváez-Barandica, J.C.**, Aguirre-Pabón, J.C. and E. Marquez (submitted) Exploring genetic patterns and life history traits of marine species in the Colombian Caribbean: insights and limitations. *Diversity and Distributions*.

The findings contribute to the understanding of genetic structure in marine species within the Colombian Caribbean and underscore the importance of considering multiple factors in shaping genetic and phylogeographic patterns. Overall, this study provides valuable insights into the life history and genetic structure of marine species in the Colombian Caribbean, offering a framework for future investigations and conservation efforts in the region.

## 5.2 Introduction

Marine organisms have strategies to proliferate across the marine environment. Among them is the larval stage, which refers to the developmental stage of an organism between hatching or birth and the onset of adulthood. The larval stage is characterized by significant morphological, physiological, and behavioral changes that allow adaptation to different environments and ecological niches. This stage has also helped marine species reach connectivity among populations because larval development is the strategy that increases dispersal. However, organisms that go through direct development from embryo to juvenile have limited dispersal and low genetic connectivity. In addition, some organisms with limited dispersal lack a pelagic state because of alternative strategies like parental care or egg deposition in capsules.

For these reasons, marine species' dispersal potential is considered one of the biological attributes correlated with phylogeographic and genetic structure (Cowen, 2002; Cowen et al., 2006; Pelc et al., 2009). This potential is interpreted as the pelagic larval duration (PLD). However, the relationship between larval duration and gene flow is a complex and ongoing debate in the scientific community. While larval duration is an essential factor, other elements, such as habitat, resource availability, and species interactions, can significantly impact a species' genetic structure (Blanco et al., 2016; Riginos et al., 2001). Disparities in available habitats can give rise to genetically unique populations, while interactions between individuals and their environment during different life stages can promote or impede gene flow (Baums et al., 2006; Dong et al., 2012; Yu et al., 2018). These conditions are crucial for natural selection and can have a profound effect on genetic structure (Arndt et al., 1998; Haye et al., 2014; Kelly et al., 2010; Modica et al., 2017; Mattos et al., 2019; Loera-Padilla et al., 2021; Stark et al., 2021).

Nevertheless, research has indicated that species with longer pelagic larval phases typically exhibit less genetic substructuring (Arndt & Smith, 1998; Kelly & Palumbi, 2010; Haye et al., 2014; Mattos et al., 2019; Stark et al., 2021), while those with shorter or non-pelagic larvae often display phylogeographic breaks or genetics (Arndt & Smith, 1998; Pelc et al., 2009; Kelly & Palumbi, 2010; Haye et al., 2014; Villamor et al., 2014). Despite its complexity, PLD can be considered a reliable predictor of marine population genetics. Investigations focused on biogeographic areas have shown that PLD is a predictor for identifying genetic and phylogeographic patterns of marine species (Cowen et al., 2006; Ayre et al., 2009; Kelly & Palumbi, 2010; Haye et al., 2014, 2019). However, there are

inconclusive results relating to the  $F_{ST}$  and PLD values of various species obtained from investigations conducted in different marine locations worldwide (Weersing & Toonen, 2009; Luiz et al., 2012). Thus, biogeographic regions could be the best places to investigate the role of PLD in predicting the population genetic characteristics of marine species.

Researchers are encouraged to investigate the potential of pelagic larval duration (PLD) as a predictive factor for the genetic structure of marine organisms in diverse environments, exemplified by the Caribbean Sea of Colombia. This region provides a unique research opportunity owing to its distinctive geological history, marked by shifts in coastlines and the emergence of mountain systems during the recent ice age. In particular, geological studies indicate that the Sierra Nevada de Santa Marta's current location was influenced by the Santa Marta fault around 0.75 million years ago (Betancur et al., 2010). The Magdalena River mouth has also undergone multiple changes, shifting eastward to Galerazamba two million years ago and later moving toward Cartagena during the Pleistocene period (2 million to 10 thousand years ago) before reaching its present location (Flórez, 2003).

Colombian Caribbean experiences varying environmental conditions, characterized by temperature stratification from the Guajira to the southwest, influenced by the semi-permanent upwelling in the Guajira peninsula. Salinity exhibits an opposite gradient, attributed to discharges from the Magdalena, Sinú, and Atrato rivers (Bernal et al., 2006; Lozano et al., 2010). This region also is impacted by two significant ocean currents, the Caribbean Current (CC) and the Caribbean Counter Current (CCC), originating from the North Brazil Current and the Panama-Colombia Gyre, respectively. These currents contribute to upwelling events, particularly near the Guajira Peninsula, due to offshore winds and the Coriolis effect (Andrade, 2015; Correa-Ramirez et al., 2020; Orfila et al., 2021). The upwelling is strong from December to May, with weaker effects from June to August (Gómez and Acero, 2020; Orfila et al., 2021). Seasonal upwelling also occurs between Santa Marta and the Tayrona National Natural Park during peak northern trade winds from December to March (Gómez and Acero, 2020). Furthermore, between these two upwelling zones, shallow rocky substrates are absent along 300 km of coastline and constitute the specific habitat for several marine species.

A comprehensive understanding of ocean currents, river discharges, variation in the structure of coastal seabed, and upwelling events is vital when examining their impact on the genetic and phylogeographic structure of marine life in the Colombian Caribbean. For instance, in Chapter 3 was determined that the spatial pattern of most species exhibiting a high level of genetic structuring coincides with three zoogeographic subareas proposed by Díaz (1995) for the Colombian Caribbean. As a result of his research on the biogeography of marine gastropods in the southern Caribbean, Díaz (1995) proposed five subareas, of which three are distributed within the marine sector of Colombia. The first subarea stretches from the mouth of the Magdalena River to Costa Rica (Isthmian). The second encompasses the marine sector from the eastern side of the mouth of the Magdalena River to the eastern side of Tayrona Natural National Park (Samaritan), where

the third subarea begins and extends to the Paraguaná Peninsula in Venezuela (Goajira). Variations in continental shelf size, predominant bottom types, calm or turbulent water conditions, water mass transparency, temperature, salinity, and distinct habitat types collectively distinguish these three subareas (For further details, refer to Díaz, 1995; **Figure 2-1**).

Considering the spatial pattern documented in **Chapter 3**, 15 marine species were selected for this study, each with samples from locations belonging to the three subareas. Our review suggests that certain species are affected by the ecophysic factors abovementioned. These factors are correlated with the species that displayed high values of the Wright fixation indices and a short period of PLD (**Table 5-1**). To further investigate these findings, we compiled  $F_{ST}$  and  $\Phi_{ST}$  values and the number of populations of these 15 marine species to evaluate genetic patterns and their relationships with life history traits. We also evaluated the relationships between PLD and fixation indices to create predictive models for genetic structure from approximate PLD values. These findings will be a helpful starting point for further studies.

## 5.3 Materials and Methods

### 5.3.1 Data source

Over 25 marine species have been genetically studied in the Colombian Caribbean. However, not all of them have been sampled from the Gulf of Urabá (southwest) to the Guajira peninsula (north). Therefore, considering the spatial pattern described in **Chapter 3**, 15 marine species were selected for this study, each with samples from locations belonging to the three subareas. For these species, period larval duration (PLD) information was not available. Therefore, minimum and maximum values documented for sister species reared under captive or natural conditions were assumed, except for *Cittarium pica*, which estimated an average PLD of 4.5 days (**Table 5-1**). The number of populations or genetic clusters ( $K$ ) and the overall or average fixation index ( $F_{ST}$  or  $\Phi_{ST}$ ) were also recorded for each species. In cases where the study included locations outside the Colombian marine sector (e.g., *Equinometra lucunter lucunter*), the average fixation index was calculated considering values recorded in locations from all three subareas.

### 5.3.2 Data analysis

In order to ascertain overarching patterns of genetic structure in the Colombian Caribbean, averages were computed for fixation index values across organism groups (vertebrates and invertebrates), fecundity (low and high), dispersal potential (low and high), habitats (pelagic and benthopelagic, rocky bottoms, and soft bottoms), and

molecular markers (mitochondrial DNA control region, microsatellite and SNP). Additionally, linear regression analyses were performed between PLD, the number of populations, and the overall  $F_{ST}$  or  $\Phi_{ST}$  values for each species. PLD was treated as the independent variable. In the  $F_{ST}$  analysis, values were logarithmically transformed. Given the uncertainty surrounding larval settlement times, regression analyses utilized average PLD values derived from the documented minimum and maximum values in the literature. Thus, regression plots were presented with average PLD values. This analysis included and excluded species with PLD = 0 (*Sciades proops* and *Rhizoprionodon porosus*).

A second type of analysis was exclusively carried out on seven species that have been studied using microsatellite and SNP markers. This analysis aimed to assess the relative significance of these markers in predicting the genetic structure of marine species in the Colombian Caribbean.

**Tabla 5-1.** Marine Species Studied Across the Geographical Scope of the Colombian Caribbean (From The Guajira peninsula to Capurganá). Minimum, maximum, and average values of pelagic larval duration (PLD) are provided for the species, ecological, biological, and genetic characteristics (including fixation index and number of populations), and the main findings from their genetic studies.

Species	Habitat/Reproductive aspects	PLD in days (PLD considered for analysis)	Number of populations or clusters	Loci number and molecular marker	Values of fixation indices	Main findings
<i>Lutjanus synagris</i>	Rocky and sandy bottoms (0 - 400 m) External fertilization High fecundity.	20 – 22 (21) Clarke et al. (1997)	2	Ten species-specific microsatellite loci	$F_{ST} = 0.068$	Two populations without geographical pattern were identified. Ocean currents are responsible for genetic connectivity. One of the populations was identified in the narrowing of the continental shelf in Tayrona National Natural Park (Aguirre et al., in review).
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	Soft and mixed bottoms (0-500 m), common in bays and estuaries Internal fertilization Live-bearing, lacks pelagic larvae Low fecundity.	0	2	mtDNA control region	$F_{ST} = 0.188$	Two populations were identified. Genetic differentiation between La Guajira and southwestern localities of the Colombian Caribbean (Almanza, 2014).
<i>Littopenaeus schmitti</i>	Soft muddy bottoms (0 - 37 m) External fertilization and high fecundity Breeding in lagoons and estuaries; Migration of juveniles and adults to sea; Reproduction occur in the sea.	12 – 14 (13) García-Pinto & Ewald (1974)	3	Eight species-specific microsatellite loci	$F_{ST} = 0.030$	Three populations were identified. The La Guajira showed the greatest genetic difference from the rest of the localities. The Caribbean Counter Current facilitates genetic exchange (Valle et al., 2015).



Species	Habitat/Reproductive aspects	PLD in days (PLD considered for analysis)	Number of populations or clusters	Loci number and molecular marker	Values of fixation indices	Main findings
<i>Caranx hippos</i>	Pelagic habitat, soft bottoms, and seagrass beds, less common around reefs (0 - 350 m); External fertilization High fecundity Multiple spawns in two reproductive periods.	48 – 58 (53) Leis et al. (2006); Mair et al. (2012); Donati et al. (2021)	1	mtDNA control region	$F_{ST} = 0.030$	Two co-distributed genetic lineages were identified. There is no genetic differentiation among localities. The migratory behavior of adult fish and larval dispersal through the Caribbean Counter Current facilitate genetic connectivity and the distribution of genotypes of the two genetic lineages (Caiafa et al., 2018).
<i>Mugil incilis</i>	Benthopelagic habitat (0 - 35 m) External fertilization High fecundity Adults migrate from lagoons to the adjacent sea to reproduce. Juveniles develop in estuaries and lagoons.	20 – 30 (25) Monteiro-Rivas & Bonecker (2001)	2	Seven heterologous microsatellite loci	$F_{ST} = 0.107$	Two populations were identified. Genetic differentiation between the Morrosquillo Gulf and the northeastern localities. The Caribbean Counter Current and the internal currents of the Morrosquillo Gulf play a role in connectivity and genotype segregation, respectively (Mendoza et al., 2019).
<i>Equinometra lucunter lucunter</i>	Shallow rocky bottoms or coral reefs (0 - 10 m) External fertilization High fecundity.	23 Benavides (2020)	2	Ten species-specific microsatellite loci	$F_{ST} = 0.050$	Two populations without a geographical pattern were determined. The PLD time and the currents are responsible for genetic connectivity (Benavides, 2020).

Species	Habitat/Reproductive aspects	PLD in days (PLD considered for analysis)	Number of populations or clusters	Loci number and molecular marker	Values of fixation indices	Main findings
<i>Penaeus (Farfantepenaeus) notialis</i>	Soft and mixed bottoms (3 - 50 m) External fertilization High fecundity Breeding in lagoons and estuaries Migration of juveniles and adults to the adjacent sea Spawning events occur on the continental shelf.	12 – 14 (13) Dall et al. (1990)	3	Four species-specific and three heterologous microsatellite loci	$\Phi_{ST} = 0.0691$	Three populations were identified. There is significant genetic differentiation between La Guajira and the rest of the southwestern localities. The narrowing of the continental shelf due to the Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) foothills and semi-permanent upwelling in La Guajira are responsible for the genetic differences. The Caribbean Counter Current is responsible for facilitating genetic connectivity among the southwestern localities (Atencia et al., 2021).
<i>Mugil liza</i>	Bentopelagic habitat (0 - 135 m), inhabits soft and mixed bottoms, and near the reef. External fertilization High fecundity Adults migrate from lagoons to the adjacent sea for reproduction; juveniles are raised in lagoons and estuaries.	20 – 40 (30) Alvarez-Lajonchere et al. (1991); Monteiro-Rivas & Bonecker (2001)	2	Nine heterologous microsatellite loci	$F_{ST} = 0.086$	Identification of two populations without a geographical pattern. The migratory behavior of adult fish and larval dispersion through the Caribbean Counter Current facilitates genetic connectivity and the distribution of genotypes between the two populations (Aguirre et al., 2022).
<i>Octopus insularis</i>	Shallow mixed bottoms,	40 – 52 (46)	1	6769 SNPs	$\Phi_{ST} = 0.007$	A single population was

Species	Habitat/Reproductive aspects	PLD in days (PLD considered for analysis)	Number of populations or clusters	Loci number and molecular marker	Values of fixation indices	Main findings
	sandy and rocky (0 - 30 m), tidal pools Internal fertilization High fecundity Parental care during embryogenesis.	Villanueva & Norma (2008)				determined. The behavior of the paralarva, its PLD time, and the Caribbean and Counter Caribbean currents facilitate gene flow between localities (Puentes, 2021).
<i>Cittarium pica</i>	Rocky shoreline (intertidal and supralittoral) External fertilization High fecundity.	3 – 6 (4.5) Bell (1997); Velazco & Barros (2017)	3	Ten species-specific microsatellite loci	$F_{ST} = 0.050$	With both markers, three populations were identified, one in La Guajira, another in Santa Marta, and the third located between Cartagena and Capurganá (southwest). It exhibits a genetic break caused by the combination of the absence of specific habitat and the semi-permanent upwelling in La Guajira. The Caribbean Counter Current facilitates genetic connectivity among the southwestern localities (Narváez-Barandica et al., 2023).
			3	55151 SNPs	$\Phi_{ST} = 0.081$	
<i>Nerita tessellata</i>	Rocky shoreline (intertidal and supralittoral) External fertilization High fecundity.	60 – 120 (90) Underwood (1975); Waters et al. (2005); Reisser et al. (2013)	1	21333 SNPs	$\Phi_{ST} = 0.006$	A single population was determined. The PLD duration and the Caribbean Counter Current play a facilitating role in the genetic connectivity among localities (Narváez-Barandica et al., 2023).

Species	Habitat/Reproductive aspects	PLD in days (PLD considered for analysis)	Number of populations or clusters	Loci number and molecular marker	Values of fixation indices	Main findings
<i>Acanthemblemaria rivasi</i>	Shallow rocky bottoms Inhabits reefs at depths of 0 to 10 m; in holes surrounded by <i>Millepora</i> barnacles; in holes of <i>Millepora</i> or <i>Acropora palmata</i> corals External fertilization Low fecundity Parental care of eggs.	22 – 25 (23.5) Johnson & Brothers (1989)	3	66325 SNPs	$\Phi_{ST} = 0.230$	Three populations were determined: one in La Guajira, another in Santa Marta, and the third located between Cartagena and Capurganá. It presents two genetic breaks caused by the combination of the effect of the absence of specific habitat and the semi-permanent upwelling in La Guajira, and the plume of the Magdalena River (Narváez-Barandica et al., 2023).
<i>Melongena melongena</i>	Soft bottoms (0 - 5 m) In the marine sector near coastal lagoons or estuaries Internal fertilization High fecundity Eggs deposited in capsules where larvae develop Larvae hatch and can remain suspended for up to two days.	0 – 2 (1) Clench & Turner (1956)	3	41907 SNPs	$\Phi_{ST} = 0.111$	Three populations were determined, one located in La Guajira, the second between the Gulf of Salamanca and Cartagena, and the third between the Morrosquillo and Urabá Gulfs (southwest). It presents a genetic break caused by the combination of the effect of the narrowing of the continental shelf due to the foothills of the SNSM and the absence of lagoons and estuaries (Chapter 3).
<i>Sciades proops</i>	Soft bottoms (0 - 20 m) in the marine sector, near	0 Bruton (1996);	3	15158 SNPs	$\Phi_{ST} = 0.179$	Three populations, one located in La Guajira, the

Species	Habitat/Reproductive aspects	PLD in days (PLD considered for analysis)	Number of populations or clusters	Loci number and molecular marker	Values of fixation indices	Main findings
	coastal lagoons or river mouths External fertilization Low fecundity Oral incubation of eggs and parental care of larvae.	Acero (2003)				second one between the Gulf of Salamanca and the coastal line of the Atlantic Department, and the third one between the Gulfs of Morrosquillo and Urabá. It presents two genetic breaks caused by the narrowing of the continental shelf due to the San Andres-Sucre Mud Volcano (SNSM), and the other by the presence of a reef system in the Barú Peninsula (Cartagena) (Chapter 3).
<i>Micropogonias furnieri</i>	Soft bottoms (1 - 120 m) in the marine sector, near coastal lagoons, estuaries, or river mouths External fertilization High fecundity.	30 – 50 (40) Fabiano et al. (2016)	1	215 SNP	$\Phi_{ST} = 0.008$	A population was determined. The PLD time and the action of the Caribbean Counter Current are facilitating factors of genetic connectivity (Chapter 3).



## 5.4 Results

### 5.4.1 Generalities of the life history traits and genetic structure of the species

The literature review has facilitated the identification of 25 marine species investigated within the geographical confines of the Colombian Caribbean. However, some studies were limited to the sector from Santa Marta to the Guajira (*Chelonia mydas*, Vásquez-Carrillo et al., 2020) or from Santa Marta to the Gulf of Urabá (*Stegaster partitus*, Ospina-Guerrero et al., 2008; *Lutjanus synagris*, Landínez-García et al., 2009; *Sparisoma aurofrenatum*, Velasco-Montoya et al., 2022; *Madracis auretenra*, Ballesteros-Contreras et al., 2022; *Acropora cervicornis* and *A. palmata*, García et al. 2022); while others focused on the western side of the Magdalena River plume (*Lobatus (Strombus) gigas*, Marquez et al., 2013; *Maguimithrax spinosissimus*, Hurtado-Alarcón et al., 2018; *Orbicella faveolata*, Alegría-Ortega et al., 2021; *O. faveolata* and *Agaricia undata*, Rodríguez et al., 2023). Nevertheless, this investigation encompassed 15 species with samples collected across the expanse stretching from La Guajira to the Urabá Gulf and the border adjoining Panama. Among these species, seven are fishes (*Lutjanus synagris*, *Caranx hippos*, *Mugil incilis*, *Mugil liza*, *Acanthemblemaria rivasi*, *Sciades proops*, and *Micropogonias furnieri*); four species fall within the molluscan classification (*Octopus insularis*, *Cittarium pica*, *Nerita tessellata*, and *Melongena melongena*). Additionally, there are representatives from the crustacean realm, specifically *Penaeus notialis* and *Littopenaeus schmitti*, along with the echinoderm *Equinometra lucunter lucunter* and the shark species *Rhizoprionodon porosus*.

These species occupy a spectrum of ecological habitats, ranging from rocky substrates (*L. synagris*, *A. rivasi*, *C. pica*, *N. tessellata*, *O. insularis*, *E. lucunter lucunter*) to soft, sandy, and mixed bottoms along the coastal region (*P. notialis*, *L. schmitti*, *M. liza*, *M. furnieri*, *C. hippos*, *R. porosus*), extending further to encompass lagoons and estuaries (*M. incilis*, *M. liza*, *P. notialis*, *L. schmitti*, and *M. melongena*). These species exhibit an array of reproductive strategies, spanning from external to internal fertilization (*R. porosus*, *O. insularis*, and *M. melongena*), encompassing phenomena such as male oral incubation and parental care (*S. proops*), male-driven egg parental care (*A. rivasi*), and female-mediated embryogenesis (*O. insularis*). Other strategies include larval development within capsules (*M. melongena*) and viviparity (*R. porosus*). Furthermore, the presence or absence of pelagic larvae is a salient characteristic of these species. Select species that demonstrate migratory behavior from lagoons to adjacent seas for reproductive purposes (*M. incilis*, *M. liza*, *P. notialis*, and *L. schmitti*). In contrast, the majority partake in reproductive events within the marine milieu. Significant variability in pelagic larval duration (PLD) is evident, ranging from minimal intervals of 0 days (*S. proops* and *R. porosus*) to an extensive 90-day period (*N. tessellata*), with a mean PLD of 24.3 days.

To scrutinize the genetic structure of these species, a diverse array of molecular markers were harnessed, including microsatellite loci (*L. synagris*, *M. liza*, *M. incilis*, *P. notialis*, *L. schmitti*, *E. lucunter lucunter*, and *C. pica*), mitochondrial DNA control region (*R. porosus* and *C. hippos*), and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (*O. insularis*, *C. pica*, *M. melongena*, *N. tessellata*, *A. rivasi*, *S. proops*, and *M. furnieri*). Notably, the number of loci exhibited variation across studies, with investigations employing SNPs registering the highest tally, ranging from 215 in the case of *M. furnieri* to 66325 in *A. rivasi*. The number of microsatellite loci varied among species, ranging from seven (*P. notialis* and *M. incilis*) to ten loci (*L. synagris*, *C. pica*, *E. lucunter lucunter*).

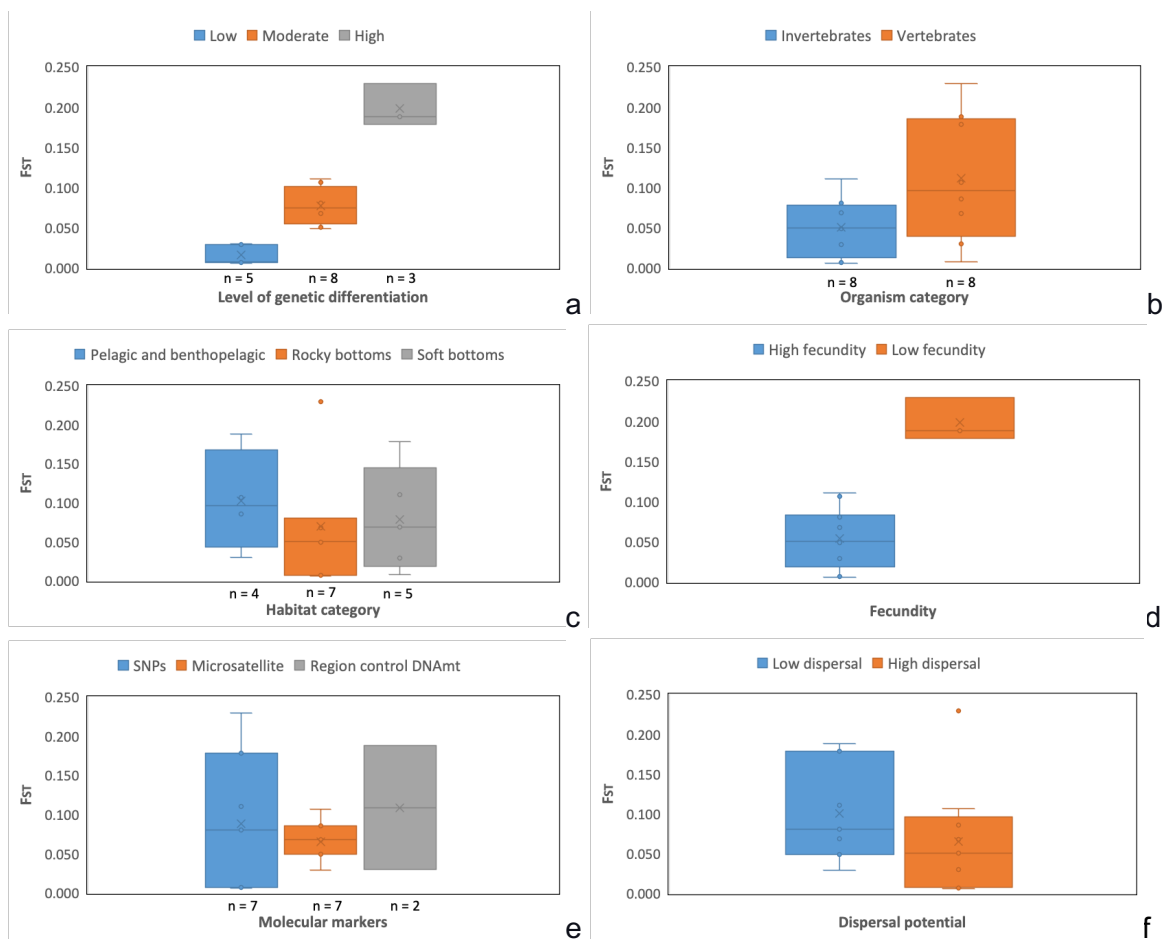
The averaged fixation index ( $F_{ST}$ ) values demonstrated a range from 0.006 (*N. tessellata*) to 0.288 (*A. rivasi*), with an overarching mean of 0.081 ( $\pm 0.068$  standard deviation). Five species exhibited a low level of genetic differentiation ( $F_{ST} < 0.05$ ), while eight displayed a moderate differentiation (0.05 – 0.15), and three demonstrated a high differentiation ( $> 0.15$ ) (**Figure 5-1a**). These outcomes allude to distinct degrees of genetic structure among populations. Vertebrate species ( $0.112 \pm 0.080$ ) emerged as bearing a higher degree of substructuring relative to their invertebrate counterparts ( $0.051 \pm 0.036$ ) (**Figure 5-1b**). Concerning habitat specificity, pelagic or benthopelagic species ( $0.103 \pm 0.066$ ) exhibited a heightened average  $F_{ST}$  in juxtaposition to species inhabiting soft-bottom environments ( $0.079 \pm 0.068$ ) and rocky substrates ( $0.070 \pm 0.076$ ) (**Figure 5-1c**). In the case of fecundity, species with low fecundity exhibited a higher level of structuring ( $0.199 \pm 0.027$ ) compared to those with high fecundity ( $0.054 \pm 0.037$ ) (**Figure 5-1d**). Respecting molecular markers, studies employing the mitochondrial DNA control region ( $0.109 \pm 0.112$ ) and SNPs ( $0.089 \pm 0.090$ ) and microsatellite loci ( $0.066 \pm 0.026$ ) demonstrated moderate  $F_{ST}$  levels (**Figure 5-1e**). Finally, species with low dispersal exhibited a higher level of structuring ( $0.101 \pm 0.062$ ) compared to those with high dispersal ( $0.066 \pm 0.072$ ) (**Figure 5-1f**).

Interpreting the genetic study findings furnishes noteworthy revelations about the genetic framework of the species under investigation. Specifically, a quartet of species was designated as inhabiting a singular population within the geographical expanse of the Colombian Caribbean (*C. hippos*, *N. tessellata*, *O. insularis*, and *M. furnieri*). In contrast, five species exhibited a dual-population framework (*L. synagris*, *M. liza*, *M. incilis*, *R. porosus*, and *E. lucunter lucunter*). Among these, two species manifested discernible geographic patterns (*M. incilis* and *R. porosus*), whereas the remaining three showcased co-distributed populations among the surveyed localities. An additional sextet of species presented a trinary population delineation, including *P. notialis*, *L. schmitti*, *C. pica*, *M. melongena*, *A. rivasi*, and *S. proops*.

In the context of studies that postulated a single or dual population framework bereft of geographical patterning, adult migratory behaviors, extended PLD values, and the Caribbean Counter Current were identified as pivotal factors shaping genetic connectivity among distinct locales. Conversely, species exhibiting geographically patterned dual or



trinary populations evinced a recurrent inclination for one population to be distributed across the La Guajira (*P. notialis*, *L. schmitti*, *C. pica*, *M. melongena*, *R. porosus*, *A. rivasi*, and *S. proops*), with the notable exception of *M. incilis*. In specific cases, a secondary population was observed to be prevalent within the marine sector of Santa Marta (*C. pica* and *A. rivasi*). Meanwhile, other species exhibited a population distribution extending from the western fringe of Santa Marta to the Bolívar Department (*P. notialis*, *M. melongena*, and *S. proops*), while *R. porosus* alone demonstrated an extended presence in the marine sector of the Córdoba Department. A tertiary population demarcation was identified, extending from the western edge of the Magdalena River plume to Capurganá (*C. pica* and *A. rivasi*) or spanning from the Morrosquillo Gulf to the Urabá Gulf (*M. incilis*, *P. notialis*, *L. schmitti*, *M. melongena*, and *S. proops*).



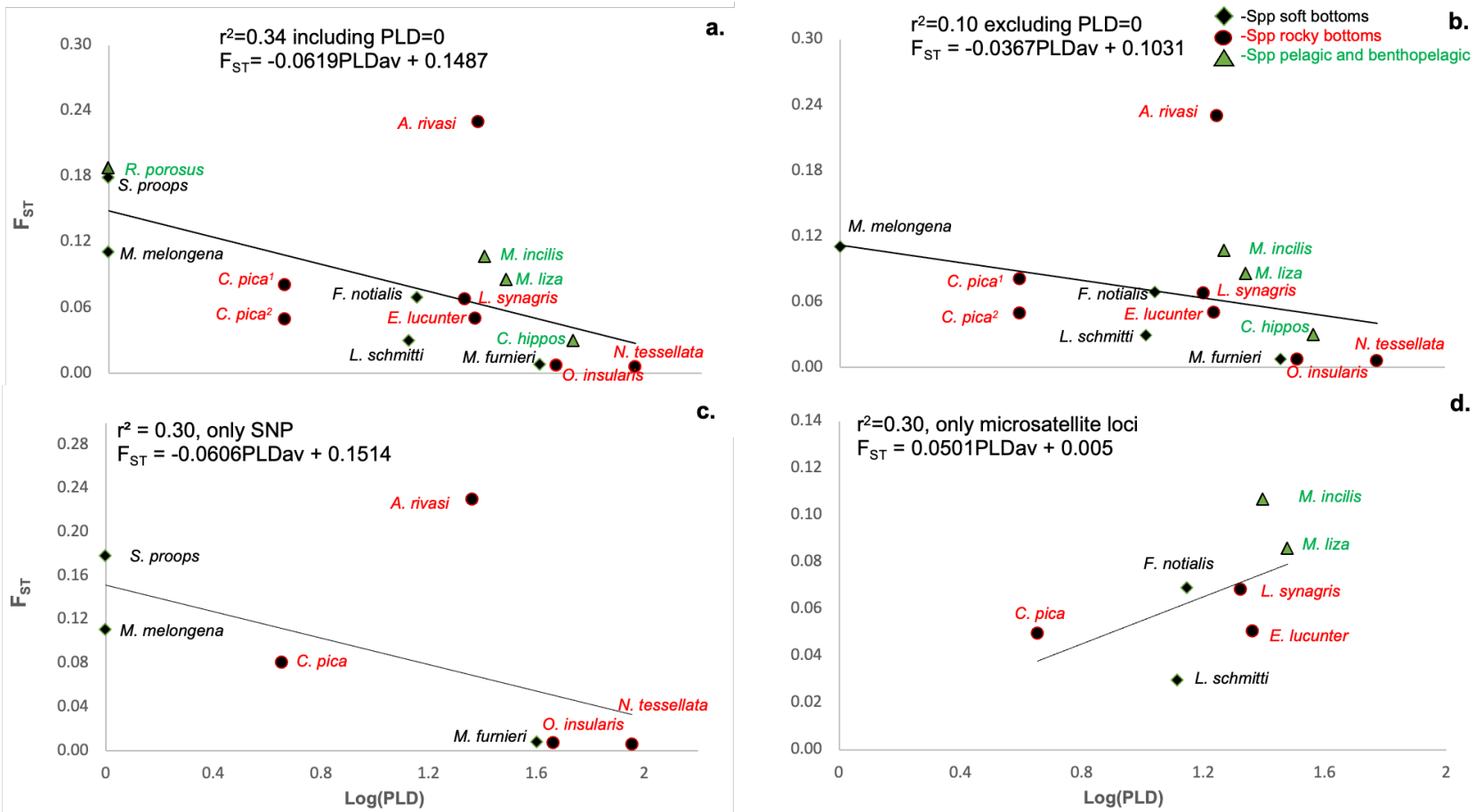
**Figure 5-1.** Box and whisker plot of fixation index values across categories of level of genetic differentiation (a), organism type (b), habitats (c), fecundity (d), molecular markers (e), and dispersal potential (f) from fifteen marine species studied within the geographical scope of the Colombian Caribbean. n indicates number of species.

Among the studied corpus of fifteen species, only four exhibited genetic discontinuities attributed to biogeographic barriers (*C. pica*, *M. melongena*, *A. rivasi*, and *S. proops*). An amalgamated effect was discerned, wherein the absence of shallow rocky substrates and the semi-permanent upwelling phenomenon in the La Guajira predominantly impacted *A. rivasi* and *C. pica*. A secondary barrier was observed to emanate from the Magdalena River plume, affecting exclusively *A. rivasi*. The tertiary barrier emerged as the constriction of the continental shelf within the Tayrona National Natural Park, attributed to the foothills of the Sierra Nevada de Santa Marta. This barrier influenced *S. proops* and *M. melongena*, with the latter experiencing an additional effect due to the absence of coastal lagoons and the upwelling in La Guajira. Ultimately, a fourth barrier has been postulated within the Barú Peninsula, distinguished by the existence of coral reef substrates and seagrass meadows. This barrier exclusively influences *S. proops* (**Figure 2-1**).

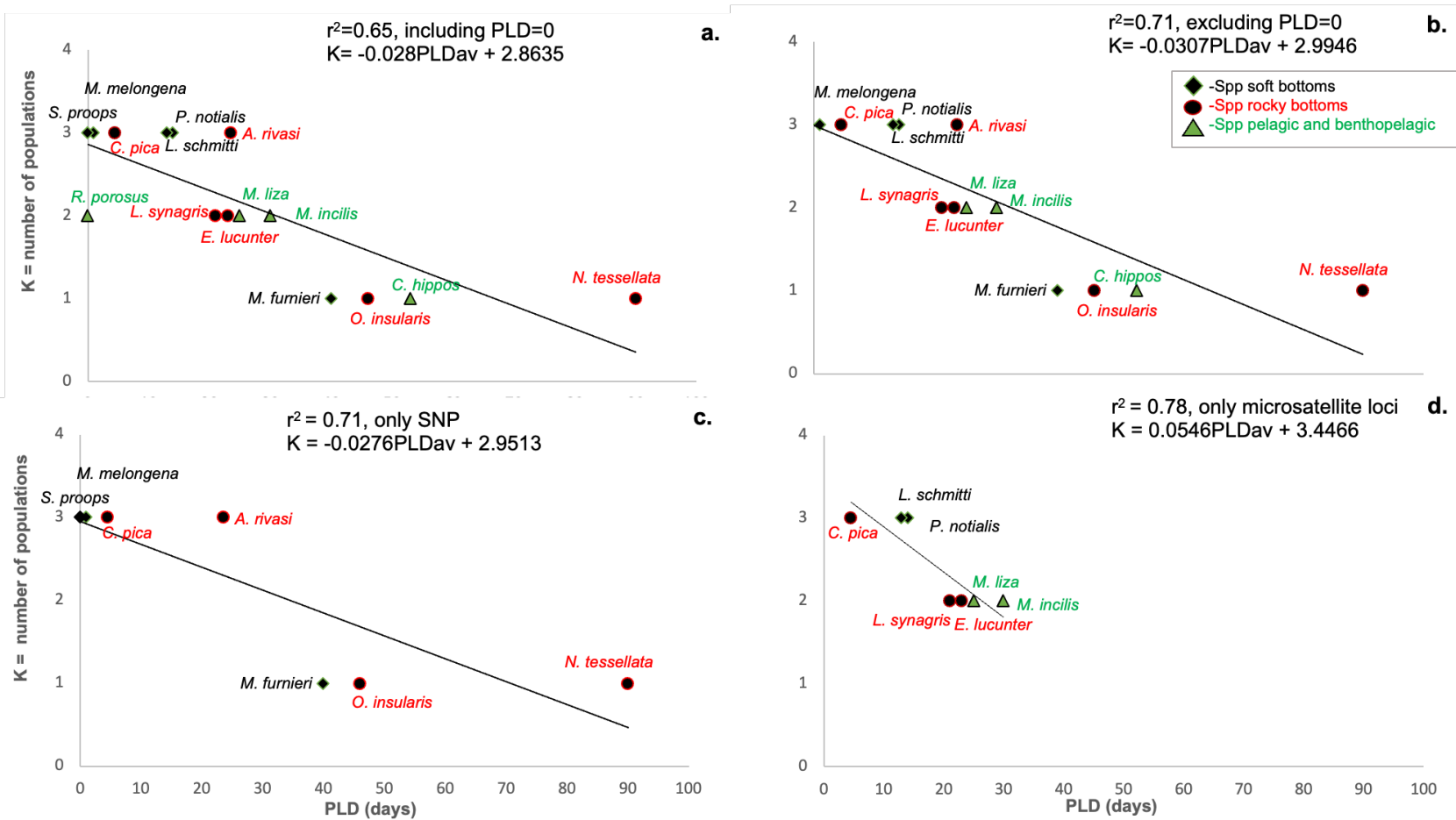
#### 5.4.2 Relationships between PLD and genetic structure

**Table 5-2** highlights the results of linear regression analyses between Pelagic Larval Duration (PLD) values, Fixation Index ( $F_{ST}/\Phi_{ST}$ ) values, and the Number of Populations (K) for marine species studied in the Colombian Caribbean. In the first set of analyses involving all species with all markers ( $n = 16$ ), three regression equations are presented, resulting from the relationships of  $F_{ST}$  values with different PLD values (average, minimum, and maximum). Notably, for  $F_{ST}$  values related to the average PLD, the  $r^2$  value is 0.40 ( $p < 0.05$ ), suggesting a moderate positive relationship (**Figure 5-2a**). Similarly, for  $F_{ST}$  values related to the minimum PLD, the  $r^2$  value is 0.39 ( $p < 0.05$ ). However, for  $F_{ST}$  values related to the maximum PLD, the  $r^2$  value is only 0.17 ( $p > 0.05$ ), indicating a weaker relationship between the two variables. The relationships were insignificant when species lacking a pelagic larval stage were excluded from the analyses involving all three markers (**Figure 5-2b**) and SNPs (**Table 5-2**).

Regarding the analyses involving species analyzed using SNP markers ( $n = 7$ ), the relationship was moderate between  $F_{ST}$  values and average PLD ( $r^2 = 0.30$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 5-2c**). The relationship was also moderate when related to maximum PLD ( $r^2 = 0.35$ ,  $p < 0.05$ ) and minimum PLD ( $r^2 = 0.35$ ,  $p < 0.05$ ). For species analyzed using microsatellite loci ( $n = 7$ ), the results similarly revealed a moderate relationship between  $F_{ST}$  values and average and maximum PLD ( $r^2 = 0.30$ ,  $p < 0.05$ , and  $r^2 = 0.40$ ,  $p < 0.05$ , respectively; **Figure 5-2d**), and a shallow relationship with minimum PLD ( $r^2 = 0.17$ ,  $p > 0.05$ ). Finally, the analyses involving the number of populations (K) and its relationship with PLD showed higher  $r^2$  values than  $F_{ST}$  analyses. For instance, in the analysis involving all species with all markers, the  $r^2$  value for K related to average PLD is 0.65 (**Figure 4a-d**). In fact, the relationship yielded a higher  $r^2$  value when considering species analyzed with microsatellite loci (0.80,  $p < 0.05$ ) (**Table 5-2**).



**Figure 5-2.** Relationship between global genetic structure determined by the fixation index ( $F_{ST}/\Phi_{ST}$ ) and the average duration of pelagic larval stage (PLD) for fifteen marine species, including (a) and excluding (b) species lacking a pelagic larval stage, associated with shallow bottoms and pelagic environments in the Colombian Caribbean. Analyses were conducted considering the seven species studied using SNPs (c) and the other seven using microsatellite loci (d).



**Figura 5-3.** Relationship between the number of populations (K) and the average duration of pelagic larval stage (PLD) for fifteen marine species, including (a) and excluding (b) species lacking a pelagic larval stage, associated with shallow bottoms and pelagic environments in the Colombian Caribbean. Analyses were conducted considering the seven species studied using SNPs (c) and the other seven using microsatellite loci (d).

**Tabla 5-2.** Results of linear regression analyses between PLD values, fixation index ( $F_{ST}$ /  $\Phi_{ST}$ ) values, and number of populations (K) for marine species studied in the Colombian Caribbean. Results include all species analyzed with three molecular markers and those studied using SNP and microsatellite loci. The procedure was also conducted, excluding species lacking a pelagic larval stage. The asterisk denotes regressions with a significance level (P value) of < 0.05. n indicates number of species.

<b>All species with all markers (n = 16)</b>	<b>Species analyzed by SNP (n = 7)</b>	<b>Species analyzed by Microsatellite loci (n = 7)</b>
$F_{ST} = -0.0619PLD_{av} + 0.1487$ $r^2 = 0.34^*$	$F_{ST} = -0.0606PLD_{av} + 0.1514$ $r^2 = 0.30^*$	$F_{ST} = 0.0501PLD_{av} + 0.0050$ $r^2 = 0.30^*$
$F_{ST} = -0.048PLD_{min} + 0.1240$ $r^2 = 0.39^*$	$F_{ST} = -0.0592PLD_{min} + 0.1453$ $r^2 = 0.26^*$	$F_{ST} = 0.0342PLD_{min} + 0.0270$ $r^2 = 0.17$
$F_{ST} = -0.062PLD_{max} + 0.1610$ $r^2 = 0.17$	$F_{ST} = -0.0675PLD_{max} + 0.1656$ $r^2 = 0.35^*$	$F_{ST} = 0.0602PLD_{max} + 0.0108$ $r^2 = 0.40^*$
$F_{ST} = -0.0336PLD_{av} + 0.1101$ $r^2 = 0.08$ , excluding PLD = 0	$F_{ST} = -0.0444PLD + 0.1233$ $r^2 = 0.13$ , excluding PLD = 0	
$K = -0.028PLD_{av} + 2.8635$ $r^2 = 0.65^*$	$K = -0.0276PLD_{av} + 2.9513$ $r^2 = 0.71^*$	$K = 0.0546PLD_{av} + 3.4466$ $r^2 = 0.78^*$
$K = -0.0385PLD_{min} + 2.9402$ $r^2 = 0.68^*$	$K = -0.0402PLD_{min} + 3.0335$ $r^2 = 0.75^*$	$K = 0.0677PLD_{min} + 3.4928$ $r^2 = 0.80^*$
$K = -0.021PLD_{max} + 2.7942$ $r^2 = 0.60^*$	$K = -0.0205PLD_{max} + 2.8860$ $r^2 = 0.68^*$	$K = 0.0388PLD_{max} + 3.2590$ $r^2 = 0.66^*$
$K = -0.0307PLD_{av} + 2.9946$ $r^2 = 0.71$ , excluding PLD = 0	$K = -0.02PLD + 2.8455$ $r^2 = 0.63^*$ , excluding PLD = 0	

## 5.5 Discussion

Our review determined that the genetic/phylogeographic structure of 25 marine species across the Colombian Caribbean has been investigated in 20 documents. Out of this total, ten species were excluded from our analyses due to being sampled in a restricted area. Nonetheless, these studies had interesting objectives. The studies conducted on the western side of the Magdalena River mouth aimed to assess, at a finer scale, the connectivity of coral species between reefs of continental islands, as well as between these latter and oceanic islands in the Colombian Caribbean (*O. faveolata*, Alegría-Ortega et al., 2021; *O. faveolata* and *A. undata*, Rodríguez et al., 2023). The same applied to certain marine vertebrates (*C. mydas*, Vásquez-Carrillo et al., 2020) and invertebrates (*L. gigas*, Marquez et al., 2013; *M. spinosissimus*, Hurtado-Alarcón et al., 2018). The results were relevant for comprehending levels of diversity and genetic connectivity, aiding the development of management and conservation strategies for species and ecosystems. Species covering a larger area, excluding the Guajira sector, concurred on the importance of marine currents and variation in the continental shelf in understanding species' genetic structure (*L. synagris*, Landínez-García et al., 2009; *M. auretenra*, Ballesteros-Contreras et al., 2022; *A. cervicornis* and *A. palmata*, García et al. 2022). They also agreed on the impact of long larval periods of certain species on the high levels of connectivity observed between localities (*S. partitus*, Ospina-Guerrero et al., 2008; *S. aurofrenatum*, Velasco-Montoya et al., 2022; *M. auretenra*, Ballesteros-Contreras et al., 2022; *A. cervicornis* and *A. palmata*, García et al. 2022).

### 5.5.1 Generalities of the life history and genetic structure of the 15 species

Our review has led to the identification and characterization of fifteen marine species inhabiting the diverse ecological landscapes of the Colombian Caribbean. A notable diversity was observed from the La Guajira to the Urabá Gulf and adjacent to Panama, with representatives from various taxonomic groups, including fish, mollusks, crustaceans, echinoderms, and shark species. These organisms exhibit various reproductive strategies, ranging from external to internal fertilization, including unique behaviors such as egg care, male oral incubation, and female-mediated embryogenesis. Notably, the presence or absence of pelagic larvae emerges as a critical factor influencing the potential for dispersal and genetic connectivity of these species.

Among studies, molecular markers such as microsatellite loci, mitochondrial DNA control region, and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were employed to ascertain the genetic structure of these species. It is essential to highlight that the number of loci used varied among species, with SNPs revealing the highest level of genetic resolution. This pattern may reflect the utility of SNPs in delineating levels of genetic substructuring and species' phylogeography (McCormack et al., 2013; Reitzel et al., 2013; Leaché & Oaks, 2017), even at previously undetected scales (D'Aloia et al., 2020).

Fixation Index ( $F_{ST}$ ) values unveiled distinct degrees of genetic structure, with most species exhibiting moderate levels of genetic differentiation. Vertebrate species displayed a higher degree of substructuring compared to their invertebrate counterparts. However, this pattern is not universal and could be attributed to number limited of species registered and factors such as the lack of pelagic larvae (*S. proops* and *R. porosus*), low fecundity (*A. rivasi*), or intermediate pelagic larval duration (*M. liza*, *M. incilis*, and *L. synagris*). Concerning fecundity, species with reduced fecundity and dispersal displayed a higher level of genetic structuring than their high fecundity and dispersal counterparts. This trend aligns with the observation that low fecundity species exhibit a distinct set of attributes, such as the absence of pelagic larvae, forms of parental care, and the presence of two (*R. porosus*) to three populations (*S. proops* and *A. rivasi*). Likely, other undocumented biological, ecological, and behavioral conditions for these species may play an additional role in genetic structuring levels (Barry et al., 2021; Hernawan et al., 2021).

Our review demonstrated that habitat preferences and molecular markers contribute to varying levels of genetic differentiation without a discernible pattern. However, species revealed variable population frameworks, ranging from singular to dual and even trinary population delineations. Notably, species lacking geographic patterns suggest the influence of adult migratory behaviors, high dispersal potential, and ocean currents on genetic connectivity. A pattern that is recurrent across different marine regions worldwide (Kelly & Palumbi, 2010; Haye et al., 2014; Modica et al., 2017; Mattos et al., 2019; Hernawan et al., 2021; Loera-Padilla et al., 2021; Stark et al., 2021).

In an additional context, it is pertinent to highlight the Colombian Caribbean as a biogeographically significant area characterized by four biogeographic barriers spanning a linear distance of 1000 km and are distributed across three subareas proposed by Diaz (1995). These barriers, in turn, play a fundamental role in inducing genetic discontinuities in species that exhibit substantial levels of genetic structuring, as well as in those that display traits such as low fecundity, absence of pelagic larval stages, limited PLD, and manifestations of parental care. Specifically, these mentioned barriers take shape as follows: i) the absence of shallow rocky substrates between Santa Marta and Cabo de la Vela, concomitantly influenced by the semi-permanent upwelling phenomenon in La Guajira (affecting *A. rivasi* and *C. pica*), which belongs Goajira subarea; ii) the convergence of the continental shelf in Santa Marta (*S. proops* and *M. melongena*), localized in Samarian subarea; iii) the fluvial influence of the Magdalena River (*A. rivasi*), which delimits the Samarian and Isthmian subareas; and iv) the presence of a reef system in the Barú Peninsula (*S. proops*), localized in the middle of Isthmian subareas from Colombian Caribbean (**Figure 2-1**).

The geomorphological and ecological configuration reinforces the observation that the Colombian Caribbean represents a transitional enclave with notable implications for the genetic structure of marine species, a phenomenon akin to what occurs in other marine regions on a global scale. Those regions that show genetic breaks include the Atlantic-Mediterranean transition (Potarnello et al., 2007; Lowe et al., 2012; Marie et al., 2016),

the coast of California and Oregon (Sotka et al., 2004; Kelly & Palumbi, 2010; Sivasundar & Palumbi, 2010), the Benguela current upwelling zone (Reid et al., 2016), the coast of Chile (Brante et al., 2012; Haye et al., 2014, 2019), and southeastern Australia (Ayre et al., 2009). For instance, in the Atlantic-Mediterranean transition, the Strait of Gibraltar and the Almeria-Oran Front are associated with step changes in allele frequencies (Lowe et al., 2012). In addition, Patarnello et al. (2007) described evolutionary events that point to a combined signature of vicariance, paleoclimate fluctuation, and life-history traits on the Atlantic-Mediterranean phylogeographical patterns. On the other hand, along the coast of California and Oregon, breaks caused by an oceanographic gradient and an upwelling jet are observed north of Monterey Bay, Cape Mendocino (California), and Cape Blanco (Oregon) for fishes (Sivasundar & Palumbi, 2010) and species of rocky intertidal community (Sotka et al., 2004; Kelly & Palumbi, 2010). Similarly, along the coasts of Chile, the presence of a genetic break attributed to an upwelling zone at 32°S was determined (Brante et al., 2012; Haye et al., 2014, 2019). Lastly, in the southeastern region of Australia, a genetic connectivity break is observed among three rocky shore-associated species, attributed to the presence of a biogeographic barrier spanning over 300 km of sandy shoreline (Ayre et al., 2009).

### **5.5.2 Relationships between PLD and genetic structure: insights and limitations for the Colombian Caribbean**

This review delves into the complex relationship between Pelagic Larval Duration (PLD) and genetic structuring within co-distributed marine species across the geographical expanse of the Colombian Caribbean, spanning from La Guajira to the Gulf of Urabá. Employing linear regression analyses, the study investigated associations between PLD values and genetic differentiation, considering microsatellite loci and SNPs. The findings underscore the importance of considering diverse PLD metrics and molecular markers, revealing intriguing insights into genetic connectivity and dispersal potential among marine species in the region.

The research reveals moderately positive associations between PLD values and genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) when considering all data and analyzing all markers, including microsatellite loci and SNPs. The significant relationships observed for both average and maximum/minimum PLD metrics highlight the necessity of accounting for various PLD durations to accurately predict the level of genetic structuring, as demonstrated in other studies (Dawson et al., 2014). Marine connectivity and the relationship between PLD and genetic metrics of dispersal have been the focus of several studies. Previous tests have reported conflicting results, with some studies showing a poor correlation between global  $F_{ST}$  and PLD (Weersing & Toonen, 2009; Riginos et al., 2011), while other studies found a moderate and low correlation (Kelly & Palumbi, 2010; Selkoe & Toonen, 2011; Dawson et al., 2014). Additionally, the type of genetic marker used, and the sampling design can



significantly affect the genetic metrics (Selkoe and Toonen, 2011). Our study indicates that number of localities sampled varied among species (4 to 10 sites). These findings challenge the prevailing belief that PLD is an effective predictor of gene flow and population structure in marine ecosystems. Notably, the correlation between genetic estimates and PLD should be considered, as it is significant despite differences in measurements and the presence of measurement errors in both genetic and PLD metrics (Selkoe & Toonen, 2011; Faurby & Barber 2012). Overall, more robust sampling designs and consideration of other biophysical correlates of population substructure are needed to better understand marine connectivity in the Colombian Caribbean.

On the other hand, the relationships between the number of populations (K) and PLD exhibit higher  $r^2$  values than conventional Fixation Index analyses. Specifically, when considering all species with all markers, the  $r^2$  value for K related to average PLD was 0.65, albeit weakened when excluding species lacking larvae. However, a more detailed examination of the relationship between PLD and K reveals an even stronger correlation when species analyzed with microsatellite loci and SNPs are included. In this context, the relationship yields a higher  $r^2$  value exceeding 0.70, emphasizing the significant influence of these markers on capturing the impact of PLD on number of populations. The correlation between the number of populations (K) and PLD in marine species remains insufficiently explored. Our study sheds light on this aspect, paving the way for further research to ascertain the significance of PLD in predicting the number of populations in marine species.

The observed results align with the hypothesis that longer PLD durations may facilitate greater opportunities for dispersal, subsequently influencing genetic connectivity among populations and configure the structure genetic of marine species (Arndt y Smith, 1998; Cowen, 2002; Hellberg et al, 2002; Kinlan & Gaines, 2005; Dawson et al., 2006; Pelc et al., 2009; Kelly & Palumbi, 2010; Haye et al., 2014; Modica et al., 2017; Mattos et al., 2019). While debates regarding PLD's role as a predictor of gene flow and population structure exist, it is noteworthy that these discussions are often based on studies conducted in disparate marine regions without considering species co-distribution (Weersing & Toonen, 2009; Riginos et al., 2011). In contrast, studies focused on species co-distributed within ecologically transitional biogeographic regions, such as the Colombian Caribbean, highlight the importance of PLD in explaining genetic structure (Kelly & Palumbi, 2010; Dawson et al., 2014; Hernawan et al., 2021). Comparative genetic and phylogeographic studies underscore the critical role of experimental design, emphasizing the significance of species co-distribution in investigating the broader impacts of gene flow disruption on organismal communities (Avice, 2009).

Considering the above, the results presented in this study serve as a valuable reference for future investigations aimed at evaluating the genetic and phylogeographic patterns of marine species in the Colombian Caribbean. Researchers can hypothesize based on information regarding PLD in model species and employ the functions described in **Table 5-2** to predict number of populations with an accuracy exceeding 70%, albeit with lower predictive power for the level of genetic substructuring. Furthermore, those investigations

must select sites across the three marine subareas described by Díaz (1995), spanning from La Guajira to the Panama border. Additionally, the type of molecular marker used in the study should be carefully considered, as it can influence predictive outcomes. While microsatellites yielded similar results to SNPs, future investigations are encouraged to prioritize the use of SNPs due to their superior resolution capabilities for determining genetic structure (McCormack et al., 2013; Reitzel et al., 2013; Leaché & Oaks, 2017; D'Aloia et al., 2020).

The discussion also underscores the importance of incorporating other biological and ecological factors, both contemporary and historical, in understanding marine species' genetic and phylogeographic patterns. Factors such as reproductive strategies, fecundity, developmental stages, habitat availability, historical events, ocean currents, geomorphology, and ecological conditions contribute to the complex genetic landscape of marine species. These factors warrant consideration when interpreting research outcomes (Arndt y Smith, 1998; Kyle and Boulding, 2000; Hellberg et al., 2002; Siegel et al., 2003; Sotka et al., 2004; Cowen et al., 2006; Ayre et al., 2009; Betancur et al., 2010; Kelly y Palumbi, 2010; Dawson et al., 2014; Haye et al., 2014; Dalongeville et al., 2016; Fratini et al., 2016; Modica et al., 2017; Mattos et al., 2019; Hernawan et al., 2021).

### 5.5.3 Recommendations for conservation

A comprehensive conservation approach is necessary to safeguard marine species' genetic structure and life history traits in the Colombian Caribbean. Our review underscores the need for targeted conservation strategies that emphasize genetic connectivity. In pursuit of this goal, we propose adopting management plans that account for biogeographic barriers, and the physical, chemical, and geological conditions of the three subareas as they significantly influence species' genetic structure. A typical pattern of genetic differentiation between the samples collected in the Goajira subarea and the other subareas was observed. Therefore, genetic management units (GMUs) should be established to prioritize conservation and fisheries management measures for each species population at The Guajira, particularly for those exploited by fishing activities or fragile marine ecosystems like mangroves, coral reefs, and seagrass (*L. schmitti*, *P. notialis*, *C. pica*, *M. melongena*, *R. porosus*, *A. rivasi*, *S. proops*). Additional populations of *C. pica* and *A. rivasi* were identified in the Samarian subarea, which should be treated as a second GMU. The third GMU should be associated with the Isthmian subarea, containing the largest population for most species (*C. pica*, *P. notialis*, *L. schmitti*, *M. melongena*, *R. porosus*, *M. incilis*, *A. rivasi*, *S. proops*).

Given the potential impact of pelagic larvae on genetic connectivity, it is imperative to conserve migration corridors and dispersal routes to maintain gene flow among populations. Achieving this objective involves safeguarding migratory pathways and promoting sustainable fishing practices, particularly for species that serve as valuable fisheries resources and exhibit migratory patterns, such as shrimps (*L. schmitti* and *P.*

*notialis*), mullets (*M. incilis* and *M. liza*), and jack crevalle (*C. hippos*). Community engagement involving residents, fishermen, and stakeholders, combined with environmental education and collaboration, can garner support for conservation measures and encourage sustainable utilization of marine resources.

Species with low fecundity and dispersal exhibit greater genetic structure. Thus, a particular focus on these species in conservation endeavors is recommended, particularly for *C. pica*, *M. melongena*, *A. rivasi*, *S. proops*, and *R. porosus*.

Concurrently, we propose conducting ongoing genetic research utilizing molecular markers such as microsatellites and SNPs to understand the genetic structure and connectivity better and detect changes over time. These data can furnish invaluable insights into the efficacy of conservation measures and facilitate adjustments to management strategies. Recognizing the influence of factors such as reproduction, larval duration, habitat availability, and ocean currents on genetic structure is crucial. Integrating these insights into management strategies can enhance the effectiveness of conservation measures. It is also pertinent to acknowledge that genetic research and understanding species' genetic structure continually evolve.

Encouraging collaboration among scientists, resource managers, and policymakers is imperative to ensure that management and conservation strategies remain current and evidence-based. Finally, the distribution ranges of marine species often transcend national borders, as is the case for most species discussed in this study. Therefore, collaboration with other countries and international organizations is strongly recommended to implement comprehensive conservation strategies encompassing the Caribbean region.

#### 5.5.4 Conclusions

The comprehensive analysis of fifteen marine species within the Colombian Caribbean has provided significant insights into their life history and genetic structure. These findings illuminate the intricate relationships between reproductive strategies, PLD, and genetic structure. The diverse ecological habitats, ranging from rocky substrates to soft bottoms, lagoons, and estuaries, contribute to the unique genetic patterns observed across species. The study highlighted the role of different molecular markers, particularly microsatellite loci, and SNPs, in unraveling genetic structure.  $F_{ST}$  values elucidated varying degrees of differentiation, underscoring the importance of fecundity and dispersal potential in shaping genetic substructuring. Biogeographic barriers within the Colombian Caribbean, such as upwelling phenomena, continental shelf features, and rocky substrates, significantly impact genetic connectivity. The functions described in this paper will serve to predict the number of populations with an accuracy exceeding 70%, albeit with lower predictive power for the level of genetic substructuring. However, more robust sampling designs and consideration of other biophysical correlates of population substructure are needed to understand better marine connectivity.

In order to ensure the conservation of marine species and their genetic diversity, tailored management strategies are proposed. These strategies should consider biogeographic barriers, protect migratory corridors, and involve stakeholders in community engagement and education initiatives. Emphasis on species with low fecundity and dispersal potential, such as *C. pica*, *M. melongena*, *A. rivasi*, *S. proops*, and *R. porosus*, is recommended. Ongoing genetic research and collaboration among scientists, policymakers, and international organizations are crucial to refining conservation measures and adapting them to evolving knowledge. By implementing comprehensive strategies that account for genetic connectivity and biogeographic features, the Colombian Caribbean can safeguard its marine species and contribute to preserving global marine biodiversity.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Se evaluó la filogeografía comparada de especies marinas con amplia y limitada dispersión en el Caribe sur (sector Colombia) ante la presencia de barreras putativas. Se seleccionaron seis especies marinas, tres de fondos rocosos: *Acanthemblemaria rivasi* (con larva pelágica <22 días), *Cittarium pica* (con larva pelágica de ida corta < 6 días) y *Nerita tessellata* (con larva pelágica >60 días). Tres especies son de aguas someras de fondos blandos: *Melongena melongena* (sin larva pelágica), *Sciades proops* (sin larva pelágica y cuidado parental) y *Micropogonias furnieri* (larva pelágica >30 días). Se utilizó la técnica ddRad-seq para analizar obtener SNPs de las seis especies.

El descubrimiento principal de este estudio radica en la identificación de cuatro barreras biogeográficas en el Caribe colombiano, las cuales ejercen influencia sobre la estructura genética y filogeográfica de las especies marinas a lo largo de una distancia de 1000 km en la línea costera continental.

A pesar de que investigaciones anteriores habían identificado que el estrechamiento de la plataforma continental debido a la elevación de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) en el Parque Nacional Natural Tayrona ocasiona una ruptura genética, este estudio revela la operación de tres barreras adicionales: la pluma del río Magdalena (PRM), el efecto combinado de la falta de fondos y litorales rocosos someros en una franja de más de 300 km, que se extiende desde el Cabo de la Vela hasta el área de Santa Marta, y el afloramiento semipermanente en La Guajira (AFR+APG), así como el sistema arrecifal y las praderas marinas en la península de Barú (PB).

Los análisis de diferenciación genética, de varianza molecular (AMOVA), PCA y los filogenéticos sugieren que cuatro especies se ajustan al modelo de cambio genético abrupto ante una barrera biogeográfica (*A. rivasi*, *C. pica*, *M. melongena* y *S. proops*). En consecuencia, todas presentaron tres poblaciones, excepto *N. tessellata* y *M. furnieri*, las cuales presentaron una sola población y se ajustan al modelo de panmixia.

Por primera vez se suministra suficientes evidencias del quiebre filogeográfico causado por la pluma del río Magdalena (PRM), principalmente para *A. rivasi*. Esto supone que

PRM debe estar actuando como barrera biogeográfica para especies marinas que tienen características biológicas y ecológicas especiales que pueden ser asociadas a aspectos reproductivos (cuidado parental, baja fecundidad), limitación en la disposición del hábitat específico, al comportamiento de las larvas y al tiempo del PLD. Sin desconocer también que las condiciones ambientales de la pluma funcionan como un filtro para las larvas que intentan cruzarla.

Otro hallazgo fue el efecto combinado que causa la ausencia del litoral y fondo rocoso somero en una distancia de línea de costa por encima de 300 km, ubicada entre el Cabo de la Vela y el sector de Santa Marta y el afloramiento semi permanente en La Guajira (AFR+APG), la cual opera para *A. rivasi* y *C. pica*. Esta pareja de especies fueron las únicas que presentaron congruencia en el patrón filogeográfico.

En las especies de fondo blandos se observó la influencia de SNSM y de factores ecológicos y oceanográficos sobre una ruptura genética entre Dibulla/Punta Gallinas e isla de Salamanca, principalmente para *M. melongena* y *S. proops*. Además, para esta última especie sobresale un quiebre adicional causado por el sistema arrecifal ubicado en la península de Barú (PB), proponiéndose como una nueva barrera putativa para el Caribe sur que deberá ser investigada con otros modelos biológicos.

El análisis multilocus de *C. pica* permitió determinar una alta congruencia genética y topológica entre los marcadores loci de SNP y las secuencias del gen COI, confirmando los efectos generalizados de la barrera (AFR+APG) en su genoma.

Los 10 loci microsatélites y los SNPs fueron congruentes en la determinación de tres poblaciones. Bajos niveles de diversidad genética se observaron con los 10 loci microsatélites y la sobrepesca puede ser una de las causas de la pérdida de información genética en *C. pica*. Las secuencias del gen COI revelaron que *C. pica* presentó un proceso de expansión poblacional reciente y cambios históricos en el tamaño efectivo de la población, que coinciden con el último periodo de glaciación.

Un análisis exhaustivo de quince especies marinas en el Caribe colombiano ha proporcionado revelaciones sobre su historia de vida y estructura genética. Estos hallazgos iluminan las intrincadas relaciones entre estrategias reproductivas, PLD y número de poblaciones y el índice de fijación ( $F_{ST}$ ). Los diversos hábitats ecológicos, desde sustratos rocosos hasta fondos blandos, lagunas y estuarios, contribuyen a los patrones genéticos únicos observados entre las especies. El estudio resaltó el papel de diferentes marcadores moleculares, en particular loci microsatélites y SNPs, en la comprensión de la estructura genética.

Los valores de  $F_{ST}$  elucidaron grados variables de diferenciación, subrayando la importancia de la fecundidad y el potencial de dispersión en la formación de subestructuras genéticas. Las barreras biogeográficas en el Caribe colombiano, como los

fenómenos de surgencia, las características de la plataforma continental y los sustratos rocosos, impactan significativamente en la conectividad genética.

## 6.2 Recomendaciones

Los resultados discutidos en esta tesis sugieren poner en consideración la utilidad de los hallazgos para futuras investigaciones y la generación de recomendaciones de conservación y manejo de las especies estudiadas.

1. El conocimiento obtenido en este estudio podrá ser aplicado para llevar a cabo la implementación de medidas de manejo y políticas para el desarrollo sostenible del aprovechamiento de estas especies por parte de las autoridades pesqueras y ambientales (Hickerson et al., 2010). El nivel de subestructuración genética observado en las seis especies sugiere:
  - a. *Nerita tessellata* y *M. furnieri* presentaron características de poblaciones panmíticas en el suroccidente del Caribe y el nivel de subestructuración genética y la identificación de quiebres filogeográficos podrían ser revelados en un diseño de muestreo de mayor cobertura geográfica. *N. tessellata* se distribuye en el oeste del Atlántico, desde Bermuda, pasando por Florida, golfo de México, península de Yucatán, Antillas hasta las costas de Brasil; mientras que *Micropogonias furnieri* se distribuye desde Centroamérica hasta Argentina, incluyendo las Antillas. En esos ámbitos geográficos deberán considerarse los estudios filogeográficos y genéticos poblacionales de estas dos especies.
  - b. En términos de conservación y manejo, este estudio contempló cuatro especies que son aprovechadas en la pesca artesanal del Caribe sur. Aquí se conjugan varios aspectos a tener en cuenta: (i) la distribución geográfica de cada población para las cuales deben considerarse como unidades de manejo genético (UMG) en las que se sugiere implementar las medidas de manejo pesquero de acuerdo a información adicional que surja en el estudio de sus historias de vida y estado de aprovechamiento pesquero. En el caso de *M. furnieri*, las estrategias para administrar su pesquería se pueden plantear en un contexto regional en todo el Caribe sur. Para el caso de *C. pica*, *M. melongena* y *S. proops*, se identificaron tres poblaciones y cada una debe considerarse como una UMG (Palsbøll et al., 2006) y, en consecuencia, ser declaradas como unidades de manejo pesquero por parte de la autoridad nacional de pesca. Urge implementar medidas de manejo pesquero para estas especies, especialmente porque de acuerdo al PLD estas especies tienen alta tasa de reclutamiento en el sector de La Guajira y en Santa Marta, lo que las hace vulnerables ante la sobrepesca en estos sectores. El caso especial es con *C. pica*, en la que surgen recomendaciones de vedas temporales durante la época de reproducción (agosto-septiembre); mayor control del esfuerzo pesquero; y la implementación de una estrategia de repoblamiento en la que se combinen los protocolos de

cultivos con marcadores moleculares específicos implementados en este estudio.

2. Basado en la revisión de los patrones genéticos de las 15 especies marinas estudiadas en el Caribe de Colombia, también surge la recomendación de garantizar su conservación y su diversidad genética. Así que se proponen estrategias de manejo adaptativas. Estas estrategias deben considerar las barreras biogeográficas, proteger los corredores migratorios e involucrar a las partes interesadas en iniciativas de participación comunitaria y educación. Se recomienda hacer hincapié en especies con baja fecundidad y capacidad de dispersión, como *C. pica*, *M. melongena*, *A. rivasi*, *S. proops* y *R. porosus*. La investigación genética continua y la colaboración entre científicos, responsables de políticas y organizaciones internacionales son cruciales para perfeccionar las medidas de conservación y adaptarlas al conocimiento que surge de nuevas investigaciones. Mediante la implementación de estrategias integrales que consideren la conectividad genética y las características biogeográficas, el Caribe colombiano puede salvaguardar sus especies marinas y contribuir a la preservación de la biodiversidad marina global.
3. La variación de las condiciones oceanográficas y ambientales del Caribe sur, sector de Colombia, indica una estratificación en la temperatura del mar, donde los valores varían de menor a mayor desde La Guajira hacia al suroccidente (Bernal et al., 2006) debido a la acción del giro Panamá-Colombia en el suroccidente y al afloramiento semi permanente en La Guajira en el nororiente. Así mismo, se observa un gradiente inverso en los valores de salinidad (Lozano et al., 2010). También se observa una distribución heterogénea del ecosistema marino litoral rocoso, el cual predomina más en los departamentos del Magdalena, Bolívar, Córdoba y al norte de La Guajira; mientras que los fondos blandos someros tienen una distribución casi homogénea, excepto en el sector del Parque Nacional Natural Tayrona, donde se estrecha la plataforma continental producto de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta. Estas condiciones ambientales deben estar ejerciendo un efecto de selección natural sobre cada población identificada, que probablemente influye en la variación de las frecuencias alélicas que definen la diferenciación genética entre las poblaciones (Hellberg et al., 2002). Futuras investigaciones deberán considerar la identificación de genes que están siendo afectados por estas variaciones ambientales (mirar ejemplo en Hohenlohe et al., 2010) y sobre todo en un periodo en el que el cambio climático está acelerando los cambios de temperatura y el pH de los océanos.
4. Las historias de vida larval de las cuatro especies estructuradas genéticamente promueven probablemente un alto porcentaje de autorreclutamiento biológico en cada población, poca dispersión de sus larvas y, en consecuencia, bajo niveles de flujo genético. La prueba de Mantel sugirió que las cuatro especies se ajustan al



modelo de aislamiento por distancia (IBD) en el que localidades cercanas presentan poca distancia genética, pero comparten información genética de manera escalonada con las localidades vecinas (stepping stone; Hellberg et al., 2002). A pesar de lo anterior, el análisis de correlograma de Mantel reveló un falso positivo del ajuste de las especies al modelo IBD y por el contrario ellas se ajustan al modelo jerárquico de poblaciones, el cual está definido cuando las especies sufren un cambio genético abrupto ante la presencia de barreras biogeográficas (Hellberg et al., 2002). Todos los estudios genéticos deberán tomar en cuenta el procedimiento del correlograma para probar la existencia o no del modelo IBD en especies marinas del Caribe sur (leer Meirmans, 2012).

5. El estudio sólo contempló peces y moluscos y aunque tuvo un acercamiento importante sobre el marco teórico de la filogeografía de especies marinas asociadas a dos ecosistemas marinos de la plataforma continental del suroeste del Caribe, se sugiere tomar en cuenta otros grupos de organismos para realizar estudios de filogeografía comparada (por ejemplo, crustáceos, corales, equinodermos, anélidos, esponjas, entre otros). Esto aumentará la posibilidad de entender cómo las barreras putativas afectan otros modelos biológicos con historias de vidas diferentes. En términos moleculares, es importante combinar los SNPs y marcadores mitocondriales.
6. Consecuente con la anterior recomendación, las funciones de las relaciones entre PLD y los descriptores de estructura genética ( $F_{ST}$  y  $K$ ) descritas en este trabajo permitirán predecir el número de poblaciones con una precisión superior al 70%, aunque con un poder predictivo menor para el nivel de subestructuración genética. No obstante, para comprender mejor la conectividad marina, se requieren diseños de muestreo más robustos y la consideración de otros correlatos biofísicos de la subestructura poblacional.
7. Idealmente se recomienda tomar en cuenta modelos biológicos de otros ecosistemas marinos costeros. Por ejemplo, especies asociadas a ecosistemas de pastos marinos, litorales arenosos, estuarios y manglares.
8. Los resultados permiten ampliar el conocimiento de la filogeografía de especies de ecosistemas someros y surge la pregunta ¿qué patrones filogeográficos exhiben las especies asociadas a ambientes profundos ante las corrientes profundas y la existencia de cañones submarinos del suroeste del Caribe, por ejemplo, el de La Aguja, río Magdalena, por citar algunos?



## 7. Bibliografía

- Acero, A. (1984) The Chaenopsidae blennies of the southwestern Caribbean (Pisces: Clinidae: Chaenopsidae). II. The genera *Acanthemblemaria*, *Ekemblemaria* and *Lucayablennius*. *Rev. Biol. Trop.* 32(1):35-44
- Acero, A.; Betancur, R. (2002). Description of *Arius neogranatensis*, a new species of sea catfish from Colombia, with an identification key for Caribbean ariid fishes. *Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology.* 6(1): 5-10.
- Acero, A.P. (2003) Ariidae. Sea catfishes. p. 831-852. In K.E. Carpenter (ed.) *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Atlantic. Vol. 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae).*
- Aguirre-Pabon, J. C., Berdugo, G. O., Narváez, J. C. (2022) Population structure and low genetic diversity in the threatened lebranche *Mugil liza* in the Colombian Caribbean. *Fisheries Research*, 256. doi: 10.1016/j.fishres.2022.106485
- Aguirre-Pabon, J., L. Chasqui, E. Muñoz, Narváez-Barandica J., (2023) Multiple origins define the genetic structure of tiger shrimp *Penaeus monodon* in the colombian Caribbean Sea. *Heliyon*, 9, e17727
- Aguirre-Pabón, J. C., T. R. Narváez, G. Orozco-Berdugo, M. A. Atencia-Galindo, Narváez-Barandica, J. C. (in review) Genetic structuring of the striped snapper *Lutjanus synagris* (PISCES: LUTJANIDAE) without geographic pattern in the Caribbean of Colombia. *Fisheries Research*.
- Alegría-Ortega, A, Sanín-Pérez, MJ, Quan-Young, LI, & Londoño-Mesa, MH. (2021) Genetic structure of *Orbicella faveolata* population reveals high connectivity among a marine protected area and Varadero Reef in the Colombian Caribbean. *Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst*, 31: 764– 776. <https://doi.org/10.1002/aqc.3489>
- Almanza, M. (2014) Análisis genético poblacional del tiburón cazón antillano, *Rhizoprionodon porosus* (Carcharhinidae), en el Caribe colombiano. Tesis de maestría en ciencias Biología-Línea Biología Marina. Convenio Universidad Nacional de Colombia-INVEMAR. Santa Marta y Bogotá. 78p.
- Almanza, M., E. Marquez & L. Chasqui (2016) Evaluación de amplificación cruzada de microsatélites para estudios de genética poblacional del Cazón antillano *Rhizoprionodon porosus* (Carcharhinidae) en el Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 45(1): 41-56. 10.25268/bimc.invemar.2016.45.1.629

- Alvarez-Lajonchere, L., Hernández-Molejón, O., & Pérez-Sánchez, L. (1991). Production Of Juveniles Of The Mullet *Mugil Liza Valenciennes*, 1836, By Controlled Reproduction In Cuba. *Ciencias Marinas*, 17(2), 47–56. <https://doi.org/10.7773/cm.v17i2.801>
- Álvarez-León, R., J. Aguilera-Quiñónez, C. Andrade-Amaya y P. Nowak (1995) Caracterización general de la zona de surgencia en La Guajira colombiana. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 19 (75): 679-694.
- Andrade C.A. (2001) Las corrientes superficiales en la cuenca de Colombia observadas con boyas de 456 deriva. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 96: 321-335.
- Andrade A., C. A. (2015) *Oceanografía dinámica de la cuenca de Colombia* (1st ed.). Cartagena de Indias: Alpha Editores.
- Arndt, A.D., & Smith, M.J. (1998). Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development. *Molecular Ecology*, 7.
- Atencia-Galindo, M.A., J.C. Narvaéz, A. Ramírez, J. Paramo, J.C. Aguire-Pabón (2021) Genetic structure of the pink shrimp *Penaeus (Farfantepenaeus) notialis* (Pérez-Farfante, 1967) (Decapoda: Penaeidae) in the Colombian Caribbean. *Fisheries Research*, 243, 106052. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106052>.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, Jr., E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, Saunders N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C. (2009) *Phylogeography: retrospect and prospect*. *Journal of Biogeography* 36:3-15.
- Ayre DJ, Minchinton TE, Perrin C. (2009) Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Mol. Ecol.*, 18:1887–1903.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, et al. (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3(10): e3376. doi:10.1371/journal.pone.0003376
- Ballesteros-Contreras, D. C., Barrios, L. M., Preziosi, R. (2022) Population structure of the shallow coral *Madracis auretenra* in the Caribbean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 9. doi: 10.3389/fmars.2022.840730
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Barber PH, Erdmann MV, Palumbi SR. (2006) Comparative phylogeography of three codistributed stomatopods: origins and timing of regional lineage diversification in the Coral Triangle. *Evolution*, 60(9):1825–1839.
- Barry, P., Broquet, T., & Gagnaire, P. (2021). Age-specific survivorship and fecundity shape genetic diversity in marine fishes. *Evolution Letters*, 6, 46 - 62.

- Baums, I. B., Miller, M. W., & Hellberg, M. E. (2005). Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Molecular ecology*, 14(5), 1377–1390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02489.x>
- Bell L. (1992) Reproduction and larval development of the West Indian top shell, *Cittarium pica* (Trochidae) in the Bahamas. *Bull Mar Sci* 51(2): 250–266
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Benavides-Serrato, M., G.H. Borrero-Pérez y C.M. Diaz-Sanchez (2011). Equinodermos del Caribe colombiano I: Crinoidea, Asteroidea y Ophiuroidea. Serie de Publicaciones Especiales de Invemar 22. Santa Marta, 384 p.
- Benavides, M. (2020) Connectivity between natural populations of the sea urchin *Echinometra lucunter lucunter* (Echinodermata: Echinoidea: Echinometridae) throughout the Caribbean región. Tesis de doctorado. Sede Caribe de la Universidad Nacional de Colombia. Santa Marta y Bogotá. 82p.
- Bernal G., G. Poveda, P. Roldán & C. Andrade (2006) Patrones de variabilidad de las temperaturas superficiales del mar en la Costa Caribe Colombiana. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30 (115): 195-208.
- Betancur-R., R., A. Acero P., H. Duque-Caro & S. R. Santos (2010) Phylogenetic and morphological analyses of a coastal fish reveal a marine biogeographic break of terrestrial origin in the Southern Caribbean. *PLoS ONE* 5(7): e11566. doi:10.1371/journal.pone.0011566.
- Bintanja, R. & van de Wal, R.S.W. (2008) North American ice-sheet dynamics and the onset of the 100,000-year glacial cycles. *Nature*, 454, 869–872.
- Bintanja, R., van de Wal, R.S.W. & Oerlemans, J. (2005) Modelled atmospheric temperatures and global sea level over the past million years. *Nature*, 437, 125–128.
- Blanco, G. (2016) Variación del ADN mitocondrial de *Cittarium pica* (Prosobranchia: Trochoidea) (Linné, 1758) en el Caribe de Colombia y sus implicaciones para la conservación. Tesis para optar el título de Maestría en Acuicultura. Universidad del Magdalena, Santa Marta, p. 99.
- Boehm, J. T., Waldman, J., Robinson, J. D. & Hickerson, M. J. (2015). Population Genomics Reveals Seahorses (*Hippocampus erectus*) of the Western Mid-Atlantic Coast to Be Residents Rather than Vagrants. *PLoS ONE*, 10(1), e0116219. doi:10.1371/journal.pone.0116219.
- Bohonak, A. J. (2002) IBD (Isolation By Distance): A program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* 93: 153-154.
- Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, et al. (2019) BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol* 15(4): e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>

- Brante, A., Fernández, M., & Viard, F. (2012). Phylogeography and biogeography concordance in the marine gastropod *Crepidatella dilatata* (Calyptraeidae) along the southeastern Pacific coast. *The Journal of heredity*, 103(5), 630–637. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess030>
- Brogan, M.W. (1994) Distribution and retention of larval fishes near reefs in the Gulf of California. *Marine Ecology Progress Series*, 115(1/2). 1-13.
- Bruton MN. (1996) Alternative life-history strategies of catfishes. *Aquat. Living Resour*, 9:35-41.4
- Caiafa-Hernandez, I., J.C. Narvaez-Barandica, A. Acero-Pizarro (2018) Genetic variation and genetic structure of *Caranx hippos* (Teleostei: Carangidae) in the Colombian Caribbean. *Rev. biol. trop* (66)1, 122-135.
- Campbell, V., Legendre, P., & Lapointe, F. J. (2011). The performance of the Congruence Among Distance Matrices (CADM) test in phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology*, 11, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-64>
- Carpenter KE, Barber PH, Crandall ED, Ablan-Lagman MCA, Ambariyanto, Mahardika GN, Manjaji-Matsumoto BM, Junio-Meñez, Santos MD, Starger CJ, Toha AHA. (2011) Comparative phylogeography of the coral triangle and implications for marine management. *J Mar Biol*. 2011: Article ID 396982, 14 p.
- Carter KE. (2002) The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 1: Introduction, molluscs, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes, and chimaeras. *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No. 5*. Rome, FAO. 600 pp.
- Cassone, B.J. & Boulding, E.G (2006) Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*, 149: 213–226. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0197-9>
- Catchen, J.M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait, J.H. & De Koning, D.-J. (2011) Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 1: 171–182.
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. & Cresko, W.A. (2013) Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol*. 22: 3124–3140.
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3), 621–631. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- Chasqui V., L., E.M. Alvarado-Chacón, N. Ardila, G.H. Borrero-Pérez, N.H. Campos y K. Mejía-Quintero (Eds.). 2022. Libro rojo de invertebrados marinos de Colombia. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Serie de publicaciones generales de INVEMAR No. 122. Santa Marta, Colombia. 388 p.
- Chiu, Y. W., Bor, H., Tan, M. S., Lin, H. D., & Jean, C. T. (2013). Phylogeography and genetic differentiation among populations of the Moon Turban Snail *Lunella granulata* Gmelin, 1791 (Gastropoda: Turbinidae). *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9062–9079. <https://doi.org/10.3390/ijms14059062>
- Clark, P.U., Dyke, A.S., Shakun, J.D., Carlson, A.E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J.X., Hostetler, S.W., McCabe, A.M. (2009) The Last Glacial Maximum. *Science*, 325, 710–714.

- Clarke, M. E., Domeier, M. L., and Laroche, W. A. (1997) Development of larvae and juveniles of the mutton snapper (*Lutjanus analis*), lane snapper (*Lutjanus synagris*) and yellowtail snapper (*Lutjanus chrysurus*). *Bull. Mar. Sci.* 61, 511–537.
- Clench, W. J.; Turner, R. D. (1956). The family Melongenidae in the western Atlantic. *Johnsonia*. 3(35): 161–188, pls 94–109.
- Cowen RK, Paris CB, Srinivasan A. (2006) Scaling of connectivity in Marine Populations. *Science*, 311: 522–27.
- Cowen, R.K. (2002) CHAPTER 7 – Larval Dispersal and Retention and Consequences for Population Connectivity. Pages 149-170. In Ed. Peter F. Sale, *Coral Reef Fishes Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem*.
- Cowman PF & Bellwood DR. (2013) Vicariance across major marine biogeographic barriers: temporal concordance and the relative intensity of hard versus soft barriers. *Proc R Soc B* 280: 20131541. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1541>
- Crandall, E.D., M.A. Frey, R.K Grosberg, and P.H. Barber. (2008) Contrasting demographic history and phylogeographical patterns in two Indo-Pacific gastropods. *Molecular Ecology* 17(2): 611-626.
- Crandall, E.D., Trembl, E.A., Liggins, L., Gleeson, L., Yasuda, N., Barber, P.H., Wörheide, G. and C. Riginos. (2014) Return of the ghosts of dispersal past: historical spread and contemporary gene flow in the blue seastar *Linckia laevigata*. *Bulletin of Marine Science* 90(1): 399-425.
- Crisci, J.V., L. Katinas, Posadas P. (2003) *Historical Bioeogeography: An Introduction*. Harvard University Press, Cambridge MA. 264 pp
- D'Aloia, C.C., Andrés, J.A., Bogdanowicz, S.M., McCune, A.R., Harrison, R.G., & Buston, P.M. (2020). Unraveling hierarchical genetic structure in a marine metapopulation: A comparison of three high-throughput genotyping approaches. *Molecular Ecology*, 29, 2189 - 2203.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. & Staples, D.J. (1990) The biology of the Penaeidae. *Advances in Marine Biology*, 27, 1–461.
- Dalongeville, A., Andrello, M., Mouillot, D., Albouy, C. and Manel, S. (2016), Ecological traits shape genetic diversity patterns across the Mediterranean Sea: a quantitative review on fishes. *J. Biogeogr.*, 43: 845-857. <https://doi.org/10.1111/jbi.12669>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in functional genomics*, 9(5-6), 416–423. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elq031>
- Dawson, M. N., Waples, R. S. & Bernardi, G. (2006) "CHAPTER 2. Phylogeography". *The Ecology of Marine Fishes: California and Adjacent Waters*, edited by Larry G. Allen and Michael H. Horn, Berkeley: University of California Press, pp. 26-54. <https://doi.org/10.1525/9780520932470-004>

- Dawson, M.N., Hays, C.G., Grosberg, R.K., & Raimondi, P.T. (2014) Dispersal potential and population genetic structure in the marine intertidal of the eastern North Pacific. *Ecological Monographs*, 84, 435-456.
- Daza-Guerra, C.A.; Martínez-Hernández, N.J. & J.C. Narváez-Barandica (2018) Aspectos poblacionales del burgao *Cittarium pica* (Gastropoda: Tegulidae) en el litoral rocoso de Santa Marta, Magdalena, Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89: 430-442.
- Deagle, B. E., Jones, F. C., Absher, D. M., Kingsley, D. M., & Reimchen, T. E. (2013) Phylogeography and adaptation genetics of stickleback from the Haida Gwaii archipelago revealed using genome-wide single nucleotide polymorphism genotyping. *Molecular ecology*, 22(7), 1917–1932. <https://doi.org/10.1111/mec.12215>
- Devlin-Durante, M.K. & I.B. Baums (2017) Genome-wide survey of single-nucleotide polymorphisms reveals fine-scale population structure and signs of selection in the threatened Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *PeerJ* 5:e4077; DOI10.7717/peerj.4077
- Derycke S, Backeljau T & Moens T. (2013) Dispersal and gene flow in free-living marine nematodes. *Frontiers in Zoology*, 10:1–12.
- Díaz-Ferguson, E., Haney, R.A., Wares, J.P., Silliman, B.R. (2010) Population genetics of a trochid gastropod broadens picture of Caribbean genetic connectivity. *PLoS ONE*, 5: e12675.
- Díaz-Ferguson, E., R. A. Haney, J. P. Wares & B. R. Silliman (2012) Genetic structure and connectivity patterns of two Caribbean rocky-intertidal gastropods, *Journal of Molluscan Studies*, 78(1) 112–118, <https://doi.org/10.1093/mollus/eyr050>
- Díaz JM (1995) Zoogeography of marine gastropods in the southern Caribbean: a new look at provinciality. *Caribb. J. Sci.* 31:104-121.
- Diniz-Filho, J. A., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., de Campos Telles, M. P., Rangel, T. F., & Bini, L. M. (2013) Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology*, 36(4), 475–485. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>
- Domínguez-Domínguez, O., Vázquez-Domínguez E. (2009) Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32: 59-70.
- Donati, G. F. A., Zemp, N., Manel, S., Poirier, M., Claverie, T., Ferraton, F., Gaboriau, T., Govinden, R., Hagen, O., Ibrahim, S., Mouillot, D., Leblond, J., Julius, P., Velez, L., Zareer, I., Ziyad, A., Leprieur, F., Albouy, C., & Pellissier, L. (2021). Species ecology explains the spatial components of genetic diversity in tropical reef fishes. *Proceedings. Biological sciences*, 288(1959), 20211574. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1574>
- Dong Y-w, Wang H-s, Han G-D, Ke C-h, Zhan X, Nakano T, et al. (2012) The Impact of Yangtze River Discharge, Ocean Currents and Historical Events on the Biogeographic Pattern of *Cellana toreuma* along the China Coast. *PLoS ONE* 7(4): e36178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036178>
- Donald, K. M., Kennedy, M., & Spencer, H. G. (2005). Cladogenesis as the result of long-distance rafting events in South Pacific topshells (Gastropoda, Trochidae). *Evolution; international journal of organic evolution*, 59(8), 1701–1711.
- Dray, S. & Dufour, A.B. (2007) The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22: 1–20.



- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973.
- Edwards, S. V., Robin, V. V., Ferrand, N., & Moritz, C. (2022). The Evolution of Comparative Phylogeography: Putting the Geography (and More) into Comparative Population Genomics. *Genome biology and evolution*, 14(1), evab176. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab176>
- Eguiarte L., E., J. A. Aguirre L., L. Jardón B., E. Aguirre P., Souza V. (2013) Genómica de poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada de Ciencias Químico-Biológicas* 16 (1): 42-56.
- Elderfield, H., Ferretti, P., Greaves, M., Crowhurst, S., McCave, I.N., Hodell, D. & A.M. Piotrowski (2012) Evolution of ocean temperature and ice volume through the mid-Pleistocene climate transition. *Science*, 337, 704–709.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, et al. (2010) Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:16196–200.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Faurby, S., & Barber, P.H. (2012) Theoretical limits to the correlation between pelagic larval duration and population genetic structure. *Molecular Ecology*, 21.
- Fenberg PB, Posbic K, Hellberg ME (2014) Historical and recent processes shaping the geographic range of a rocky intertidal gastropod: phylogeography, ecology, and habitat availability. *Ecology and Evolution* 4(16): 3244-3255. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.1181>
- Fischer, M. C., Rellstab, C., Leuzinger, M., Roumet, M., Gugerli, F., Shimizu, K. K., Holderegger, R., & Widmer, A. (2017) Estimating genomic diversity and population differentiation - an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. *BMC genomics*, 18(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3459-7>
- Flores GC & R. Cáceres (1984) *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) (Achaegastropoda: Trochidae) en las aguas costeras de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 20, 57–62.
- Flórez, A. (2003) Colombia: evolución de sus relieves y modelados, Universidad Nacional de Colombia, Red de Estudios de Espacio y Territorio, RET, Bogotá D.C.
- Foll M & OE Gaggiotti (2008) A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* 180: 977-993
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294–299.

- Foster N. L. et al. (2012) Connectivity of Caribbean coral populations: complementary insights from empirical and modelled gene flow. *Molecular ecology* 21, 1143–1157.
- Fratini S, Ragonieri L, Cannicci S (2016) Demographic History and Reproductive Output Correlates with Intraspecific Genetic Variation in Seven Species of Indo-Pacific Mangrove Crabs. *PLoS ONE* 11(7): e0158582. doi:10.1371/journal.pone.0158582
- Fu Y. X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
- García-Urueña, R., Kitchen, S. A., Schizas, N. V., (2022) Fine scale population structure of *Acropora palmata* and *Acropora cervicornis* in the Colombian Caribbean. *PeerJ*, 10, e13854. doi: 10.7717/PEERJ.13854
- Garrick, R.C.; Caccone, A.; Sunnucks, P. (2010) Inference of Population History by Coupling Exploratory and Model-Driven Phylogeographic Analyses. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 1190-1227.
- Goldstien, S. J., Schiel, D. R., & Gemmill, N. J. (2006). Comparative phylogeography of coastal limpets across a marine disjunction in New Zealand. *Molecular ecology*, 15(11), 3259–3268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02977.x>
- Gómez, G. & A. Acero (2020) Comparación de las surgencias de la Guajira colombiana y del oriente venezolano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 49 (2), 131-172.
- Grant, W.S. & B.W. Bowen (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation: *Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Greenstein, B. J., Curran H. A., & Pandolfi J. M. (1998) Shifting ecological baselines and the demise of *Acropora cervicornis* in the western North Atlantic and Caribbean Province: a Pleistocene perspective. *Coral Reefs* 17:249–261.
- Grewe, P. M., Feutry, P., Hill, P. L., Gunasekera, R. M., Schaefer, K. M., Itano, D. G., Fuller, D. W., Foster, S. D., & Davies, C. R. (2015). Evidence of discrete yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) populations demands rethink of management for this globally important resource. *Scientific reports*, 5, 16916. <https://doi.org/10.1038/srep16916>
- Gutiérrez-García, T.A. & E. Vázquez-Domínguez (2011) Comparative Phylogeography: Designing Studies while Surviving the Process. *BioScience*, 61(11): 857–868. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.11.5>
- Hartl, D.L. & Clark A.G. (1997) *Principles of population genetics*. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland, EE.UU. 542 p.
- Hastings, P. A., Eytan, R. I., & Summers, A. P. (2020). *Acanthemblemaria aceroi*, a new species of tube blenny from the Caribbean coast of South America with notes on *Acanthemblemaria johnsoni* (Teleostei: Chaenopsidae). *Zootaxa*, 4816(2), zootaxa.4816.2.5. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4816.2.5>
- Haye PA, Segovia NI, Muñoz-Herrera NC, Gálvez FE, Martínez A, et al. (2014) Phylogeographic Structure in Benthic Marine Invertebrates of the Southeast Pacific Coast of Chile with Differing Dispersal Potential. *PLoS ONE* 9(2): e88613. doi:10.1371/journal.pone.0088613

- Haye, P. A., Segovia, N. I., Varela, A. I., Rojas, R., Rivadeneira, M. M., & Thiel, M. (2019). Genetic and morphological divergence at a biogeographic break in the beach-dwelling brooder *Excirrolana hirsuticauda* Menzies (Crustacea, Peracarida). *BMC evolutionary biology*, 19(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1442-z>
- Hellberg, M. E., & Vacquier, V. D. (1999). Rapid evolution of fertilization selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Molecular biology and evolution*, 16(6), 839–848. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026168>
- Hellberg, ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR. (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*. 70:273-290.
- Herbert, T. D., Peterson, L. C., Lawrence, K. T., & Liu, Z. (2010). Tropical ocean temperatures over the past 3.5 million years. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5985), 1530–1534. <https://doi.org/10.1126/science.1185435>
- Hernández S, Stotz WB. (2004) Reproductive Biology of the “Copey” snail *Melongena melongena* (Linnaeus, 1758) in Cispatá Bay on the Caribbean coast of Colombia. *J Shellfish Res*. 23(3):849–854
- Hernawan, U.E., Lavery, P.S., Kendrick, G.A., Dijk, K.V., Ulumuddin, Y.I., Triandiza, T., & McMahon, K. (2021). Predictors of marine genetic structure in the Indo-Australian Archipelago. *Regional Studies in Marine Science*, 47, 101919.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF, Yoder AD (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avise*, 2000. *Mol Phylogenet Evol*. 54(1):291-301. doi: 10.1016/j.ympev.2009.09.016
- Hohenlohe PA, Bassham S, Etter PD, Stiffler N, Johnson EA, Cresko WA (2010) Population Genomics of Parallel Adaptation in Threespine Stickleback using Sequenced RAD Tags. *PLoS Genet* 6(2): e1000862. doi:10.1371/journal.pgen.1000862.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Hurtado-Alarcón, J.C., N.H. Campos C., A. Bermúdez T. & Márquez, E.J. (2018) Phylogeographic patterns in *Maguimithrax spinosissimus* (Decapoda: Mithracidae) from Colombian Caribbean, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 52:1, 118-137, DOI: 10.1080/00288330.2017.1353528
- Huson, H.D. & D. Bryant (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Molecular Biology and Evolution*, 23(2):254-267.
- Jacobs, D., T. A. Haney, K.D. Louie (2004) Genes, diversity, and geologic process on the Pacific coast. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32: 601 -652.
- Jackson, J. B. (1992) Pleistocene perspectives on coral reef community structure. *American Zoologist* 32:719–731.
- Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405.

- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11: 94. BioMed Central Ltd.
- Jombart T, Kendall M, Almagro-Garcia J, Colijn C (2017). "treespace: Statistical Exploration of Landscapes of Phylogenetic Trees." *Molecular Ecology Resources*, 17, 1385-1392. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12676>.
- Johnson GD, Brothers EB. (1989) *Acanthemblemaria paula*, a new diminutive chaenopsid (Pisces: Blennioidei) from Belize, with comments on life history. *Proc Biol Soc Wash* 102:1018–30.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Karl, S. A., & Hayes, K. A. (2012). Extreme population subdivision in the crown conch (*Melongena corona*): historical and contemporary influences. *The Journal of heredity*, 103(4), 523–532. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess028>
- Kelly RP, Palumbi SR (2010) Genetic Structure Among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community. *PLoS ONE* 5(1): e8594. doi:10.1371/journal.pone.0008594
- Kendall, M., V. Eldholm & C. Colijn (2018) Comparing phylogenetic trees according to tip label categories bioRxiv 251710; doi: <https://doi.org/10.1101/251710>
- Kinlan B.P. & Gaines S.D. (2005) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, 84: 2007-2020.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Krueck, N. C., Treml, E. A., Innes, D. J., and Ovenden, J. R. (2020) Ocean currents and the population genetic signature of fish migrations. *Ecology* 101( 3):e02967. 10.1002/ecy.2967
- Kyle, C. & Boulding, E. (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, 137: 835–845. <https://doi.org/10.1007/s002270000412>
- Landínez-García, R. M., S. P. Ospina-Guerrero, D. J. Rodríguez-Castro, R. Arango y Márquez E. (2009) Genetic analysis of *Lutjanus synagris* populations in the Colombian Caribbean. *Cienc. Mar.*, 35 (4): 321-331
- Lanteri, A., Confalonieri, V. (2003) Fileogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía: 185–194 (J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.). CONABIO, México.
- Larget, B. R., Kotha, S. K., Dewey, C. N., & Ané, C. (2010) BUCKy: gene tree/species tree reconciliation with Bayesian concordance analysis. *Bioinformatics* (Oxford, England), 26(22), 2910–2911. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq539>
- Leaché, A. D. & J.R. Oaks (2017) The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48: 69-84. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022645>

- Lee TH, Guo H, Wang X, Kim C, Paterson AH. (2014) SNPhylo: a pipeline to construct a phylogenetic tree from huge SNP data. *BMC Genomics*. 15:162.
- Leis, J. M., Hay, A. C., Clark, D. L., Chen, I.-S., & Shao, K.-T. (2006). Behavioral ontogeny in larvae and early juveniles of the giant trevally (*Caranx ignobilis*) (Pisces: Carangidae). *Fishery Bulletin*, 104(3), 401-414.
- Liedke, A.M.R., H.T. Pinheiro, S.R. Floeter & G. Bernardi (2020) Phylogeography of the banded butterflyfish, *Chaetodon striatus*, indicates high connectivity between biogeographic provinces and ecosystems in the western Atlantic. *Neotrop. ichthyol.* 18 (1) • 2020 • <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0054>
- Li H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27 (21):2987-93.
- Li, Y. L., & Liu, J. X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular ecology resources*, 18(1), 176–177. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12719>
- Liu, N., Chen, L., Wang, S., Oh, C., & Zhao, H. (2005). Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. *BMC genetics*, 6 Suppl 1(Suppl 1), S26. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-S1-S26>
- Lischer H. E. L., Excoffier L. (2011). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* 28 298–299. [10.1093/bioinformatics/btr642](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642)
- Loera-Padilla, F.J., Piñeros, V.J., Baldwin, C.C. et al. (2021) Phylogeography, population connectivity and demographic history of the Stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Teleostei: Labridae), in the Greater Caribbean. *Coral Reefs* <https://doi.org/10.1007/s00338-020-02036-z>
- López de Herrera, U. (2016) Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe, Cienc. nat.* 64, 2172-4547
- Lozano D., Y, J. Medellín, Navas G. (2010) Contexto climatológico y oceanográfico del Mar Caribe colombiano. Pp (53-84). En INVEMAR (Eds.). *Biodiversidad del margen continental del Caribe colombiano. Serie de Publicaciones Especiales, Invemar No. 20 p. 4588*
- Ludt W.B. & Rocha L.A. (2015) Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, 42:25–38
- Luiz Osmar J., Madin Joshua S., Robertson D. Ross, Rocha Luiz A., Wirtz Peter and Floeter Sergio R. (2012) Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes *Proc. R. Soc. B.* 279:1033–1040
- Mair, J. M., Cipriani, R., Guzman, H. M., & Usan, D. (2012) Fishery of the Green Jack *Caranx caballus* (Osteichytes: Carangidae) in Las Perlas Archipelago, Pacific Panama. *Revista de biología tropical*, 60(3), 1271–1288. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i3.1806>
- Márquez, E., Landínez-García, R. M., Ospina-Guerrero, S. P., Aicardo Segura, J., Prada, M., Castro, E. & Borda, C. (2013) Genetic analysis of queen conch *Strombus gigas* from the

- Southwest Caribbean. Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 65, 410-416.
- Martínez-Gómez, J. (2012) Historias de vida. Pp (335-378) En H. Gómez de Silva y A. Oliveras de Ita (Eds). Conservación de Aves - Experiencias en México. National Fish and Wildlife Foundation, Cipamex, CONABIO
- Mattos, G., Seixas, V.C. & Paiva, P.C. (2019) Comparative phylogeography and genetic connectivity of two crustacean species with contrasting life histories on South Atlantic sandy beaches. *Hydrobiologia* 826, 319–330. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3744-3>
- McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2013) Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 66(2), 526–538. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.007>.
- Meirmans, P.G. & Van Tienderen, P.H. (2004) GENOTYPE and GENODIVE: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4: 792–794.
- Meirmans P. G. (2012) The trouble with isolation by distance. *Molecular ecology*, 21(12), 2839–2846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05578.x>
- Meirmans, P.G. (2020) genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Mol. Ecol. Resour.* 1–6.
- Mendoza-Ureche, R., Quintero-Galvis, J. F. & Narváez-Barandica, J. C. (2019) Baja variabilidad y diferenciación genética poblacional en la “lisa”, *Mugil incilis* (Teleostei: Mugilidae) del Caribe colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 501-517.
- Miloslavich P, Díaz JM, Klein E, Alvarado JJ, Díaz C, Gobin J, et al. (2010) Marine Biodiversity in the Caribbean: Regional Estimates and Distribution Patterns. *PLoS ONE* 5(8): e11916. doi:10.1371/journal.pone.0011916.
- Mitton JB, Berg CJ & KS Orr (1989) Population structure, larval dispersal, and gene flow in the Queen Conch, *Strombus gigas*, of the Caribbean. *Biol. Bull.* 177, 356–362.
- Modica, M. V., Russini, V., Fassio, G., & Oliverio, M. (2017) Do larval types affect genetic connectivity at sea? Testing hypothesis in two sibling marine gastropods with contrasting larval development. *Marine environmental research*, 127, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.001>
- Monteiro-Rivas, W.M., Bonecker, A. (2001) Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). *Bull. Mar. Sci.* 68 (3), 427–433.
- Nadukkalam Ravindran P., Bentzen P., Bradbury I. R., Beiko R. G. (2019) RADProc: a computationally efficient de novo locus assembler for population studies using RADseq data. *Mol. Ecol. Resour.* 19 272–282. 10.1111/1755-0998.12954
- Narváez, J.C., G. Orozco, J.C. Aguirre, E. Muñoz, J. Quintero, R. Mendoza, T. Narváez, F. Bolívar, L. Castro, Duarte L. (2015) Evaluar el efecto de desborde de *Cittarium pica*, *Lutjanus synagris* y *Mugil liza* y la conectividad genética de *Lutjanus synagris* y *Mugil liza* en las áreas marinas protegidas de la territorial Caribe con criterios genéticos y ecológicos”. Informe final. Convenio número 025-2012 entre PATRIMONIO NATURAL-UNIMAGDALENA, Santa Marta, Colombia. 200p.

- Narváez-Barandica, J.C.; Quintero-Galvis, J.F.; Aguirre-Pabón, J.C.; Castro, L.R.; Betancur, R.; Acero P., A. (2023) Comparative Phylogeography of Three Marine Species with Different PLD Modes Reveals Two Genetic Breaks across the Southern Caribbean Sea. *Animals*, 13 (15), 2528.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A. & Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32: 268–274.
- Oksanen, J., et al (2020) *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.5.7.
- Orfila A, Urbano-Latorre CP, Sayol JM, Gonzalez-Montes S, Caceres-Euse A, Hernández-Carrasco I and Muñoz ÁG (2021) On the Impact of the Caribbean Counter Current in the Guajira Upwelling System. *Front. Mar. Sci.* 8:626823. doi: 10.3389/fmars.2021.626823
- Ortiz Royero, J.C. (2012) Exposure of the Colombian Caribbean coast, including San Andrés Island, to tropical storms and hurricanes, 1900–2010. *Nat Hazards* 61, 815–827. <https://doi.org/10.1007/s11069-011-0069-1>
- Ortiz, E.M. (2019) vcf2phylip v2.0: convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis. , doi: 10.5281/ZENODO.2540861.
- Ospina–Guerrero SP, Landínez–García RM, Rodríguez–Castro DJ, Arango R, Márquez E. (2008) Genetic connectivity of *Stegastes partitus* in the South Caribbean evidenced by microsatellite analysis. *Cienc. Mar.* 34: 155–163.
- Osorno A. & J.M. Díaz M (2006) Explotación, usos y estado actual de la cigua o burgao *Cittarium pica* (Mollusca: Gastropoda: Trochidae) en la costa continental del Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 35, 133-148.
- Osorno Arango, A., Gil-Agudelo, D.L., Gómez-Lemos L.A. (2009) Plan de Investigación para la Conservación de *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758). INVEMAR, Serie de Publicaciones Especiales No. 16 Santa Marta, Colombia. 72 p.
- Palsbøll, P. J., Bérubé, M., & Allendorf, F. W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in ecology & evolution*, 22(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.003>
- Papadopoulou, A., & Knowles, L. L. (2016). Toward a paradigm shift in comparative phylogeography driven by trait-based hypotheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8018–8024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601069113>
- Paradis, E., J. Claude & K. Strimmer (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language, *Bioinformatics*, 20(2): 289–290, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- Paris J. R., Stevens J. R., Catchen J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods Ecol. Evol.* 8 1360–1373. 10.1111/2041-210x.12775
- Patarnello, T., Volckaert, F.A., & Castilho, R. (2007). Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16.
- Pelc, R.A., Warner, R.R. & Gaines, S.D. (2009) Geographical patterns of genetic structure in marine species with contrasting life histories. *Journal of Biogeography*, 36, 1881–1890.

- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS & HE Hoekstra (2012) Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. PLoS ONE 7(5): e37135. doi:10.1371/journal.pone.0037135
- Pinto, L.G., & Ewald, J. (1974) Desarrollo larval del camarón blanco *Penaeus schmitti*. Burkenroad, 1936.
- Piñeros, V.J., & C. Gutiérrez-Rodríguez (2017) Population genetic structure and connectivity in the widespread coral-reef fish *Abudefduf saxatilis*: the role of historic and contemporary factors. Coral Reefs 36, 877–890. <https://doi.org/10.1007/s00338-017-1579-4>
- Porto-Hannes, I., Zubillaga, A. L., Shearer, T. L., Bastidas, C., Salazar, C., Coffroth, M. A., & Szmant, A. M. (2015). Population structure of the corals *Orbicella faveolata* and *Acropora palmata* in the Mesoamerican Barrier Reef System with comparisons over Caribbean basin-wide spatial scale. Marine Biology, 162(1), 81-98. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2560-1>
- Posada-Posada B.O. y W. Henao-Pineda. (2007) Diagnóstico de la erosión en la zona costera del Caribe. INVEMAR, Serie de publicaciones especiales No. 13, Santa Marta, 124 p.
- Poutiers G & R. Cipriani (1992) Fichas FAO de identificación para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. Comisión Europea y NORAD, Roma, 513 p.
- Puechmaille S. J. (2016) The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. Molecular ecology resources, 16(3), 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>
- Puentes, P.A. (2021) Patrón filogeográfico del pulpo común *Octopus insularis* en el Caribe de Colombia. Tesis de maestría en Biología, línea Biología Marina. Sede Caribe de la Universidad Nacional de Colombia. Santa Marta y Bogotá. 43 p.
- Quintero-Galvis, J. F., Bruning, P., Paleo-López, R., Gomez, D., Sánchez, R., Cárdenas, L. (2020) Temporal variation in the genetic diversity of a marine invertebrate with long larval phase, the muricid gastropod *Concholepas concholepas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 530–531. doi: 10.1016/j.jembe.2020.151432
- Quintero-Galvis, J.F, Ocampo-Zuleta, K., Castro-García, L., Narváez-Barandica, J. C., (in press) The low population genetic structure in the littoral gastropod *Nerita tessellata* (Neritimorpha, Neritidae) evidences high dispersal across the Caribbean Sea. (In review Journal of Experimental Marine Biology and Ecology).
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G & Suchard MA (2018) Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. Systematic Biology. syy032. doi:10.1093/sysbio/syy032
- Raj, A., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2014) fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. Genetics, 197(2), 573–589. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.164350>
- Ramírez, J. & J. García (2003) Offshore dispersal of Caribbean reef fish larvae: how far is it? Bulletin of Marine Science, 72(3): 997-1017.



- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2092–2100. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004034>
- Rangel-Buitrago, N., Idárraga-García J. (2010) Geología general, morfología submarina y facies sedimentarias en el margen continental y los fondos oceánicos del mar Caribe colombiano. Pp (30-51). En INVEMAR (Eds.). Biodiversidad del margen continental del Caribe colombiano. Serie de Publicaciones Especiales, Invemar No. 20 p. 4588
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995) An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution* (N. Y). 49: 1280–1283. Wiley/Blackwell (10.1111).
- Reid, K., Hoareau, T. B., Graves, J. E., Potts, W. M., Dos Santos, S. M., Klopper, A. W., & Bloomer, P. (2016) Secondary contact and asymmetrical gene flow in a cosmopolitan marine fish across the Benguela upwelling zone. *Heredity*, 117(5), 307–315. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.51>
- Reisser, C. M. O.; Bell, J. J.; Gardner, J. P. A. (2014) Correlation between pelagic larval duration and realised dispersal: long-distance genetic connectivity between northern New Zealand and the Kermadec Islands archipelago. *Marine Biology* 161(2): 297-312.
- Reitzel, A. M., Herrera, S., Layden, M. J., Martindale, M. Q., & Shank, T. M. (2013) Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 2953–2970. <https://doi.org/10.1111/mec.12228>
- Rippe, JP, Matz, MV, Green, EA, et al. (2017) Population structure and connectivity of the mountainous star coral, *Orbicella faveolata*, throughout the wider Caribbean region. *Ecol Evol.* 7: 9234– 9246. <https://doi.org/10.1002/ece3.3448>
- Robertson R. (2003) The edible West Indian Whelk *Cittarium pica* (Gastropoda: Trochidae): natural history with new observations. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.* 153, 27-47.
- Rocha, L. A. (2003) Patterns of Distribution and Processes of Speciation in Brazilian Reef Fishes. *Journal of Biogeography*, 30(8), 1161–1171. <http://www.jstor.org/stable/3554547>
- Rocha, L. A., Robertson, D. R., Roman, J., & Bowen, B. W. (2005) Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proceedings. Biological sciences*, 272(1563), 573–579. <https://doi.org/10.1098/2004.3005>
- Rocha, L. A., Rocha, C. R., Robertson, D. R., & Bowen, B. W. (2008) Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. *BMC evolutionary biology*, 8, 157. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-157>
- Rochette, N.C., Rivera-Colón, A.G. & Catchen, J.M. (2019) Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Mol. Ecol.* 28: 4737–4754.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 552–569. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727>

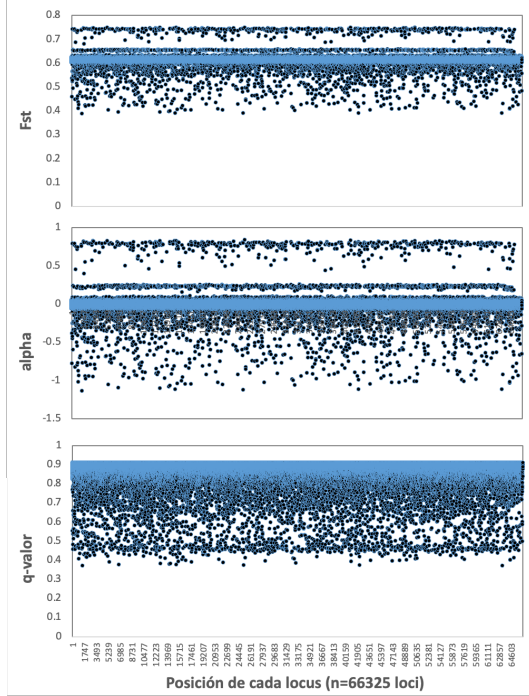
- Rousset F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4), 1219–1228. <https://doi.org/10.1093/genetics/145.4.1219>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sabelli, B. (1982) *Guía de Moluscos*. Grijalbo. Barcelona, 512p.
- Schmidt S, Wolff M, Vargas JA. (2002) Population ecology and fishery of *Cittarium pica* (Gastropoda: Trochidae) on the Caribbean coast of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 50, 3-4.
- Scudder SJ & J.R. Quitmer (1998) Evaluation of evidence of pre-Columbian human occupation at Great Cave, Cayman Brac, Cayman Islands. *Carib. J. Sci.* 34, 41-49.
- Selkoe, K.A., & Toonen, R.J. (2011) Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 291-305.
- Siegel DA, Kinlan BP, Gaylord B, Gaines SD (2003) Langrangian descriptions of marine larval dispersion. *Mar Ecol Prog Ser* 260: 83–96.
- Silva, D., K. Martins, J. Oliveira, R. da Silva, I. Sampaio, H. Schneider, G. Gomes (2018) Genetic differentiation in populations of lane snapper (*Lutjanus synagris* – Lutjanidae) from Western Atlantic as revealed by multilocus analysis. *Fisheries Research* 198: 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.10.005>
- Simon, T., Pinheiro, H.T., Santos, S., Macieira, R.M., Ferreira, Y.S.S., Bernardi, G., Rocha, L.A., Floeter, S.R., Ferreira, C.E.L. & Joyeux, J-C. (2022) Comparative phylogeography of reef fishes indicates seamounts as stepping stones for dispersal and diversification. *Coral Reefs*, <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02178-8>
- Sivasundar, A., & Palumbi, S.R. (2010) Life history, ecology and the biogeography of strong genetic breaks among 15 species of Pacific rockfish, *Sebastes*. *Marine Biology*, 157, 1433-1452.
- Song S., Bao S., Wang Y., Bao X., An B., Wang X., Liu N. (2013) Population structure and demographic history of the chukar partridge *Alectoris chukar* in China, *Current Zoology*, 59(4):458–474.
- Sotka, E. E., Wares, J. P., Barth, J. A., Grosberg, R. K., & Palumbi, S. R. (2004). Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Molecular ecology*, 13(8), 2143–2156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02225.x>
- Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson M, Halpern BS, Jorge MA, Lombana A, Lourie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia CA, Robertson J (2007) Marine Ecoregions of the World: a bioregionalization of coast and shelf areas. *BioScience* 57: 573-583.
- Spratt, R. M. & L.E. Lisiecki (2016) A Late Pleistocene sea level stack. *Climate of the Past*, 12(4): 1079-1092. [10.5194/cp-12-1079-2016](https://doi.org/10.5194/cp-12-1079-2016)

- Stark, T.E., Simoes, N. and Daly, M. (2021) Phylogeography and genetic diversity of the commercially-collected Caribbean blue-legged hermit crab (*Clibanarius tricolor*). *Conserv Genet* 22, 465–482. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01348-z>
- Sunde, J., Yıldırım, Y., Tibblin, P., & Forsman, A. (2020) Comparing the Performance of Microsatellites and RADseq in Population Genetic Studies: Analysis of Data for Pike (*Esox lucius*) and a Synthesis of Previous Studies. *Frontiers in genetics*, 11, 218. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00218>
- Tamura, K., G. Stecher, & S. Kumar (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* (<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>)
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Taylor, M.S., Hellberg M.E. (2003) Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299:107-109.
- Teske, P.R., Sandoval-Castillo, J., Waters, J. and Beheregaray, L.B. (2017) An overview of Australia's temperate marine phylogeography, with new evidence from high-dispersal gastropods. *J. Biogeogr.*, 44: 217-229. <https://doi.org/10.1111/jbi.12783>
- Toller W & S. Gordon (2005) A population survey of the West Indian topshell or whelk (*Cittarium pica*) in the U.S. Virgin Islands. Final Report. Department of Planning and Natural Resources Government of the U.S. Virgin Islands. Virgin Islands, 55p.
- Torregroza-Espinosa, A.C.; Restrepo, J.C.; Correa-Metrio, A.; Hoyos, N.; Escobar, J.; Pierini, J.; Martínez, J.M. (2020) Fluvial and Oceanographic Influences on Suspended Sediment Dispersal in the Magdalena River Estuary. *J. Mar. Syst.* 204, 103282. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2019.103282>.
- Torregroza-Espinosa, A.C.; Restrepo, J.C.; Escobar, J.; Pierini, J.; Newton, A. (2021) Spatial and Temporal Variability of Temperature, Salinity and Chlorophyll-a in the Magdalena River Mouth, Caribbean Sea. *J. S. Am. Earth Sci.* 105, 102978. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2020.102978>.
- Truelove, N.K., Kough, A.S., Behringer, D.C., C.B. Paris, S.J. Box, R.F. Preziosi & M.J. Butler IV (2017) Biophysical connectivity explains population genetic structure in a highly dispersive marine species. *Coral Reefs* 36, 233–244. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1516-y>
- Giachini Tosetto, E., Bertrand, A., Neumann-Leitão, S., & Nogueira Júnior, M. (2022). The Amazon River plume, a barrier to animal dispersal in the Western Tropical Atlantic. *Scientific reports*, 12(1), 537. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04165-z>
- Underwood, J. (1975) Comparative studies on the biology of *Nerita atramentosa* Reeve, *Bembicium nanum* (Lamarck) and *Cellana tramoserica* (Sowerby) (Gastropoda: Prosobranchia) in S.E. Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 18 (2): 153-172.
- Valle, A. G., A., Fresneda-Rodríguez, L. Chasqui & S. Caballero (2015) Diversidad Genética del Langostino Blanco *Litopenaeus schmitti* en el Caribe Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 44(2): 237-251.

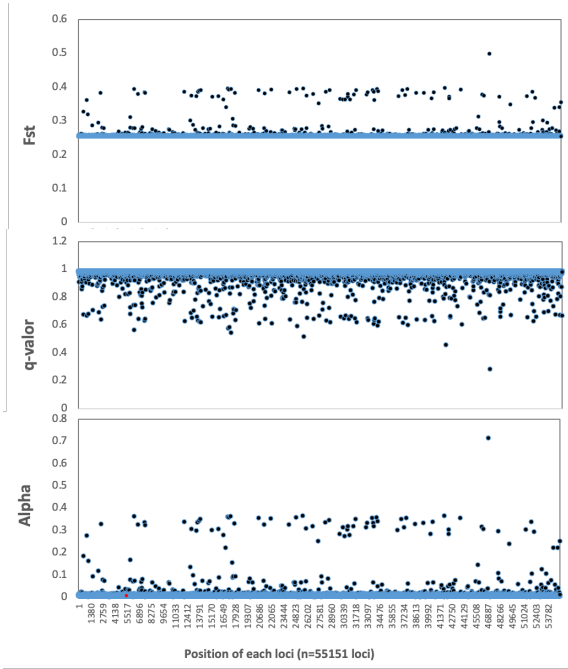
- Vazquez, E. (2007) Filogeografía y vertebrados. In: La Ecología molecular de plantas y animales: 441–466 (L. Eguarte, V. Souza, & X. Aguirre, Eds.). INE, México.
- Vásquez-Carrillo C., Noriega-Hoyos C.L., Hernandez-Rivera L., Jáuregui-Romero G.A. and Sullivan Sealey K (2020) Genetic Diversity and Demographic Connectivity of Atlantic Green Sea Turtles at Foraging Grounds in Northeastern Colombia, Caribbean Sea. *Front. Mar. Sci.* 7:96. doi: 10.3389/fmars.2020.00096
- Velasco LA, Barros J (2017) Spawning and early development of the West Indian top shell, *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758), under ex-situ conditions. *Aquat Living Resour* 30:22–32
- Velasco, L.A., Villarruel, Y., Toro, B. (2019) Nursery culture of wild and hatchery-produced juveniles of the West Indian top shell, *Cittarium pica*, fed microalgal and artificial biofilms. *Aquacult Int* 27, 1289–1299 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00386-2>
- Velasco-Montoya, D.A., Millán-Márquez, A.M. & Tavera, J. (2022) Genetic connectivity in *Sparisoma aurofrenatum* (redband parrotfish): an unexpected journey. *Hydrobiologia* 849, 1727–1741. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04806-y>
- Villamizar G., E.Y., F. Cervigón (2017) Variability and sustainability of the Southern Subarea of the Caribbean Sea large marine ecosystem. *Environmental Development*, 22: 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2017.02.005>.
- Villamor A, Costantini F. & M. Abbiati (2014) Genetic Structuring across Marine Biogeographic Boundaries in Rocky Shore Invertebrates. *PLoS ONE* 9(7): e101135. doi:10.1371/journal.pone.0101135
- Villanueva, R., & Norman, M.D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and Marine Biology*, 46, 111-208.
- Waters, J. M., King, T. M., O'Loughlin, P. M., & Spencer, H. G. (2005). Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. *Molecular ecology*, 14(9), 2789–2802. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02635.x>
- Weersing K, Toonen RJ (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Mar Ecol Prog Ser* 393:1-12. <https://doi.org/10.3354/meps08287>
- Wing ES. (2001) The sustainability of resources used by native Americans of four Caribbean islands. *Int. J. Osteoarcheol.* 11, 112-126.
- Yu, H. J., & Kim, J. K. (2018) Upwelling and eddies affect connectivity among local populations of the goldeye rockfish, *Sebastes thompsoni* (Pisces, Scorpaenoidei). *Ecology and evolution*, 8(9), 4387–4402. <https://doi.org/10.1002/ece3.3993>
- Zimmerman, S. J., Aldridge, C. L., & Oyler-McCance, S. J. (2020) An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. *BMC genomics*, 21(1), 382. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06783-9>

## **8. ANEXOS**

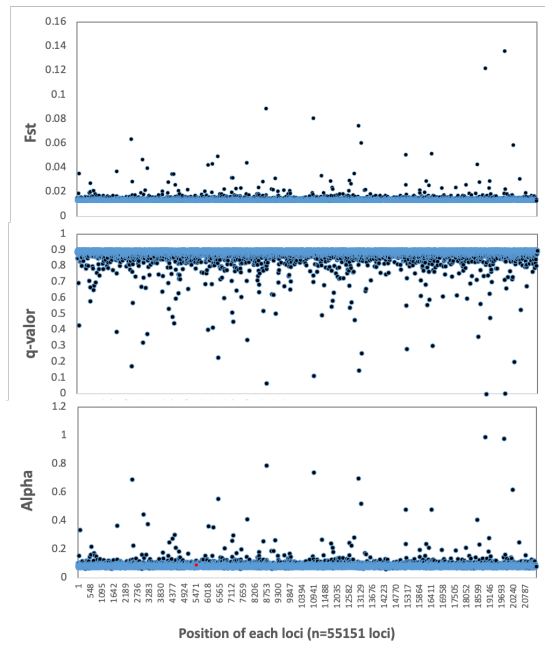
**Anexo 1.** Resultado del análisis de neutralidad de los SNPs para cada una de las especies. A. *A. rivasi*, B. *C. pica*, C. *N. tessellata*, D. *M. melongena*, E. *S. proops* y F. *M. furnieri*. G. También se presentan los resultados de los análisis con los loci de microsatélites evaluados en *C. pica*.



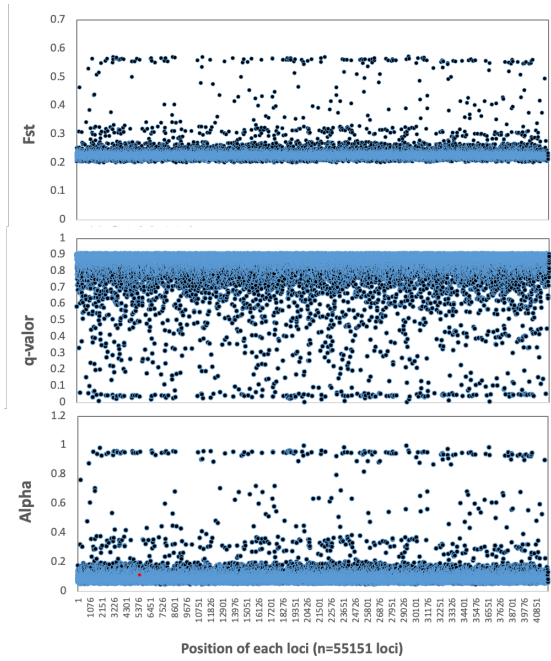
A



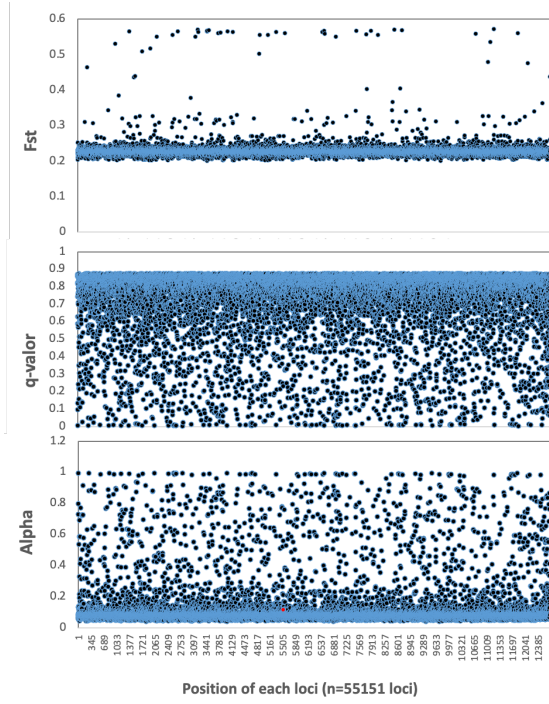
B



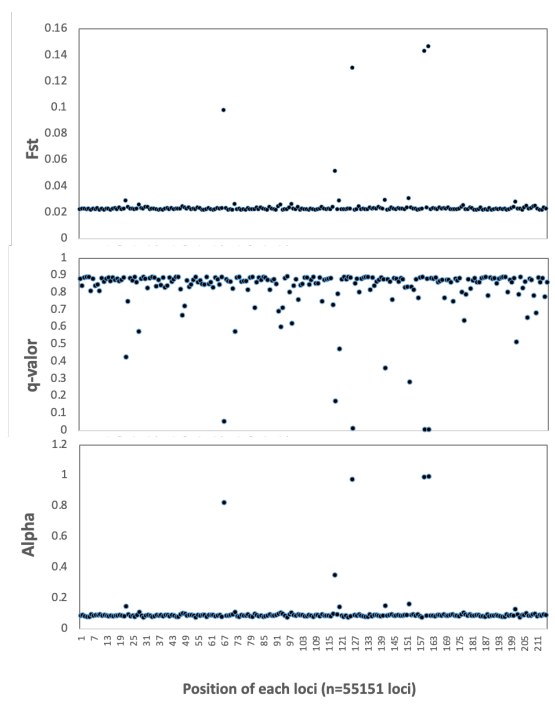
C



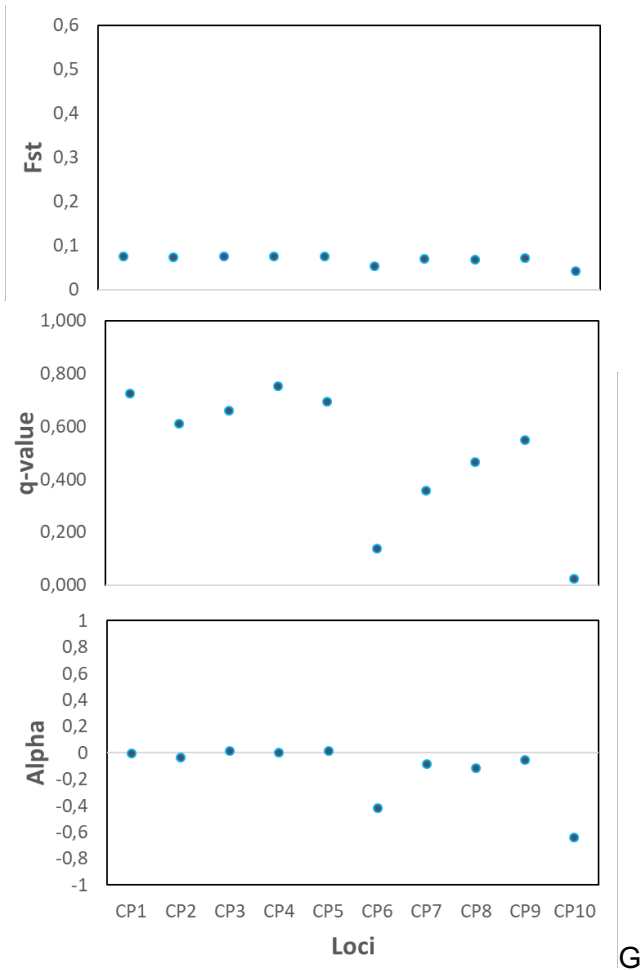
D



E



F





**Anexo 2.** Resumen de los parámetros de variabilidad genética para *A. rivasi*, *C. pica*, *N. tessellata*, *M. melongena*, *S. proops* y *M. furnieri* distribuidos entre las localidades muestreadas en el Caribe de Colombia. Valores promedios de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ); diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y endogamia (Fis).

<i>Acanthemblemaria rivasi</i>						
Localidades	Tamaño de muestra	Número de SNPs	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	$\pi$	Fis
Cabo de la Vela	19	66325	0.0004	0.0004	0.00041	-0.00002
Santa Marta	21	66325	0.0008	0.0008	0.00085	0.00016
Cartagena	14	66325	0.0009	0.0009	0.00092	0.00018
Isla Fuerte	15	66325	0.0010	0.0009	0.00096	0.00006
Capurganá	16	66323	0.0007	0.0007	0.00074	0.00014
<i>Cittarium pica</i>						
Localidades	Tamaño de muestra	Número de SNPs	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	$\pi$	Fis
Cabo de la Vela	12	55112	0.0008	0.0008	0.00088	0.00016
Santa Marta	15	55151	0.0010	0.0011	0.00114	0.00031
Cartagena	8	55151	0.0011	0.0011	0.00121	0.00034
Isla Fuerte	15	55151	0.0011	0.0012	0.00122	0.00044
Capurganá	15	55151	0.0011	0.0012	0.00122	0.00036
<i>Nerita tessellata</i>						
Localidades	Tamaño de muestra	Número de SNPs	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	$\pi$	Fis
Punta Gallinas	9	21333	0.00087	0.00093	0.00099	0.00038
Santa marta	12	21333	0.00089	0.00097	0.00102	0.00045
Cartagena	12	21333	0.00087	0.00095	0.00100	0.00042
Isla fuerte	10	21333	0.00088	0.00096	0.00101	0.00044
Capurganá	8	21333	0.00086	0.00090	0.00097	0.00031
<i>Melongena melongena</i>						
Localidades	Tamaño de muestra	Número de SNPs	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	$\pi$	Fis
La Guajira (Bahía Hondita)	10	41878	0.0008	0.0007	0.00077	-0.00003
Magdalena (Isla de Salamanca)	14	41907	0.0008	0.0008	0.00084	0.0001
Atlántico (Puerto Colombia)	13	41907	0.0009	0.0008	0.00084	-0.00008
Bolívar (Cartagena)	9	41907	0.0009	0.0008	0.00083	-0.00007
Córdoba (Coveñas-Cispatá)	4	40551	0.0008	0.0007	0.00083	0.0001
Antioquia (Turbo)	13	41907	0.0008	0.0008	0.00086	0.00009

Continuación del Anexo 2...

<i>Sciades proops</i>						
Localidades	Tamaño de muestra	Número de SNPs	Heterocigosidad obervada	Heterocigosidad esperada	$\pi$	Fis
La Guajira (Dibulla)	14	15158	0.0006	0.0006	0.0006	-0.00001
Magdalena (Isla de Salamanca)	10	15158	0.0005	0.0004	0.0004	-0.0001
Atlántico (Puerto Colombia)	10	15158	0.0004	0.0004	0.00041	0.00001
Córdoba (Cispatá)	13	15158	0.0003	0.0003	0.00029	-0.00005
Antioquia (Turbo)	11	15158	0.0003	0.0003	0.00029	0.00001
<i>Micropogonias furnieri</i>						
Localidades	Tamaño de muestra	Número de SNPs	Heterocigosidad obervada	Heterocigosidad esperada	$\pi$	Fis
La Guajira (Dibulla-Puerto Bolívar)	20	215	0.00051	0.00046	0.00048	-0.00003
Magdalena (Isla de Salamanca)	16	215	0.00059	0.00055	0.00056	-0.00008
Bolívar (Cartagena)	13	215	0.00060	0.00054	0.00058	-0.00002
Córdoba (Cispatá)	13	215	0.00051	0.00049	0.00051	0.00001
Antioquia (Turbo)	13	215	0.00051	0.00049	0.00051	0.00003

**Anexo 3.** Descripción de los iniciadores y condiciones de la PCR para el proceso de amplificación del gen COI del ADNmt para *C. pica*.

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Reaction volume	PCR conditions	Size Range (bp)	
<i>Microsatellite loci</i>						
<i>CP1</i>	(CACG) <sub>9</sub>	F: TTTGAGCAGGCTATTTGGCG R: GTGGTGGAACATAAAGGCGTC	2 µL de Buffer (10 X) + 0.4 µL of MgCl <sub>2</sub> (50 mM) + 0.2 µL of dNTPs (1 mM) + 0.04 µL of each primer F (10 mM) + 0.16 µL of each primer R (10 mM) + 0.4 µL of Taq polymerase (5 U/µL) + 1.5 µL of DNA + 5.3 µL of H <sub>2</sub> O = 10 µL	Denaturing at 95 °C for 15 min followed by 38 cycles of denaturing at 95 °C for 30 s, alignment at 55 °C for 46 s and extended at 72 °C for 45 s with a final extension at 72 °C for 30 min	230-290	
<i>CP2</i>	(TG) <sub>15</sub>	F: AGAAGGATCTTGTGGTCCGC R: TGCTAGGCAGCTTCTCACTC				170-202
<i>CP3</i>	(TGA) <sub>19</sub>	F: GACTATGATGACGTTGGTGTCG R: ACCGGTGGGAAATAACAGAAAAG				206-245
<i>CP4</i>	(CACG) <sub>8</sub>	F: GGCATGGTAGCTAGACACAC R: TGTCGCTCAGCAGAGTAAGG				239-291
<i>CP5</i>	(GAT) <sub>18</sub>	F: TGTTGCCTCAGACACACCTG R: TGATGGAAACATGCGACACC				240-300
<i>CP6</i>	(CA) <sub>11</sub>	F: TGGCATTTCAGCTAACACTTCG R: ACCGACAACCTGGATTTGCTTG				262-300
<i>CP7</i>	(ACAT) <sub>18</sub>	F: GTTCACCAATGTCCCACGAC R: GAAATCCTCGGTTTTCGCAGG				247-327
<i>CP8</i>	(GTT) <sub>9</sub>	F: GGAATTCCGGTATAGGACGC R: CGCTACGGCTGCATAAATCC				213-268
<i>CP9</i>	(TGT) <sub>13</sub>	F: TCACTGATAAACTGACATTGATGTTG R: GCATGAATTCTGGGTGAGGTG				181-218
<i>CP10</i>	(TAG) <sub>13</sub> (TTG) <sub>11</sub>	F: CAACACTTTGCGAGAGGTCG R: AGATCACCGTCCCTTCTCTG				186-241

Continuación del Anexo 4...

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Reaction volume	PCR conditions	Size Range (bp)
<i>Mitochondrial COI gen</i>					
LCO1490 HCO2198 (Folmer et al. 1994)		F: GGTC AACA AATCATAAAGATATTGG R: TAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA	2.5 µL Buffer (10X) + 1.4 µL of MgCl (50 nM) + 0.5 µL of dNTPs (1 nM) + 2 µL of each primer (10 nM) + 0.85 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL) + 2.6 µL of ADN + 13.75 µL of H <sub>2</sub> O = 25.6 µL	Denaturing at 95°C for 1 min followed by 35 cycles of denaturing at 95°C for 15 s, alignment at 50°C for 60 s and extended at 72°C for 1:30 m with a final extension at 72°C for 5 min	442







**Anexo 5.** Estimating  $F_{st}$  of Weir (1996) for each pair of localities both using the excluding null alleles correction described in Chapuis and Estoup (2007), for *Cittarium pica* from the southern Caribbean, Colombia sector.

	<b>2. Santa Marta</b>	<b>3. Cartagena</b>	<b>4. Isla Fuerte</b>	<b>5. Capurganá</b>
<b>1. Cabo de la Vela</b>	0,037	0,042	0,051	0,058
<b>2. Santa Marta</b>		0,019	0,020	0,037
<b>3. Cartagena</b>			0,006	0,018
<b>4. Isla Fuerte</b>				0,020



**Anexo 6.** Estimating null allele frequency using the EM algorithm (Dempster et al. 1977) for 10 microsatellite loci of the *C. pia*. 1. Cabo de la Vela, 2. Santa Marta, 3. Cartagena, 4. Isla Fuerte y 5. Capurganá.

Locus	Pop	Estimate of null allele frequency
1	1	42,8%
1	2	42,4%
1	3	35,4%
1	4	34,1%
1	5	35,0%
2	1	37,5%
2	2	33,3%
2	3	28,9%
2	4	23,5%
2	5	26,4%
3	1	33,7%
3	2	39,0%
3	3	38,2%
3	4	37,5%
3	5	32,1%
4	1	37,7%
4	2	28,7%
4	3	38,1%
4	4	42,1%
4	5	28,2%
5	1	37,1%
5	2	35,5%
5	3	36,5%
5	4	34,0%
5	5	34,2%
6	1	41,3%
6	2	32,1%
6	3	34,4%
6	4	34,0%
6	5	32,8%
7	1	35,4%
7	2	31,5%
7	3	47,8%
7	4	47,4%
7	5	44,9%
8	1	34,6%
8	2	41,2%
8	3	46,7%
8	4	46,1%

<b>Locus</b>	<b>Pop</b>	<b>Estimate of null allele frequency</b>
8	5	39,6%
9	1	33,7%
9	2	24,5%
9	3	34,1%
9	4	37,5%
9	5	22,5%
10	1	42,4%
10	2	36,6%
10	3	46,3%
10	4	45,3%
10	5	40,8%