



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**VARIACIÓN DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA LUEGO DE UN EVENTO
FUNDADOR EN UN PEZ INVASOR (*Pterois
volitans*) (SCORPAENIDAE)**

Javier Alfonso Torres Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Centro de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR
San Andrés, Colombia

2016

VARIACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA LUEGO DE UN EVENTO FUNDADOR EN UN PEZ INVASOR (*Pterois volitans*) (SCORPAENIDAE)

Javier Alfonso Torres Rodríguez

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Biología, Línea Biología Marina

Director:

Ph.D., Arturo Acero P.

Codirector:

Ph.D., Ricardo Betancur

Línea de Investigación:

Historia Natural

Grupo de Investigación:

Fauna Marina de Colombia, Biodiversidad y Usos

Universidad Nacional de Colombia
Centro de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR
San Andrés, Colombia

2016

Los resultados de esta investigación están dedicados exclusivamente para mi Viejita linda, mi musa adorada, mi sonrisa en la Mona Liza, mi Mariyin Monroe, la dueña y arquitecta de todo lo que soy, mi princesa en Mario Bros, mis ganas de levantarme cada día, la única llamada NO obligatoria; querida Vieja, mi Sepioutheutis, mi modelo, mi amada Vieja, esto es para ti, mi dulce amor, expreso lo mucho que te admiro y lo que estoy infinitamente agradecido y enamorado de TI, mi linda Vieja, mis palabras son nulas para expresarte mi agradecimiento, gracias y gracias nuevamente, mi profeta de la Virgen María. Ojala la sabiduría me pudiera brindar las herramientas de las curas de tus males, tanto como me lo pides, pero solo soy un amante del mar, mis alcances están maniatados, debido a la naturaleza de la vida y mi profesión, Vieja mía. Gracias Viejita mía, reconociendo la mano fuerte del siempre joven y enterito señor Humberto, carbonero y dueño del clan Torres, inspiración y motivación, sin quedarme atrás con el legado de mi Mamita, mi Tía Nanito y mi Tía Candy, Gracias.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al proyecto Invasión del pez león a los arrecifes del Caribe colombiano: biología, ecología y origen financiado por Colciencias (1361-521-28271). Al profesor Arturo Acero por su peculiar manera de instruir, a Ricardo Betancur por involucrarme en la herramienta genética en relación al pez león y por sus comentarios precisos sobre los análisis. A Sven Zea, Adriana Santos, Néstor Campos y Brigitte Gavio, por su apoyo. A Edna por mostrarme e instruirme en la herramienta genética relacionada con el ambiente marino. A la Universidad Nacional de Colombia sede Caribe, por abrir un espacio para mi formación como Magister en Ciencias Naturales – Línea Biología Marina.

A la fuerza que me da tu compañía Paola Alejandra.

A la Universidad del Magdalena, especialmente al profesor Juan Carlos Narváez, a Gilberto Jr Orozco, a Juan Carlos Aguirre y al equipo de Genética del bocachico. A la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Santa Marta, por brindar su apoyo en este proceso, a Aminta Jauregui, a Adolfo Sanjuan y al equipo administrativo.

A mis compañeros Juan David González y Luz Helena Gualdrón por su ayuda incondicional y compañía.

Resumen

El pez león *Pterois volitans* ha invadido el Atlántico occidental causando una seria disminución en el reclutamiento de peces arrecifales, afectando poblaciones de competidores y no competidores de todas las tallas, lo cual ha alterado la complejidad de la red trófica y la estabilidad arrecifal. Esta invasión constituye una problemática prioritaria debido al potencial impacto que causa en el ambiente y al sector socioeconómico, por lo cual la aplicación de todas las herramientas científicas es urgente. En este estudio se evaluó la dinámica temporal de la diversidad genética de la invasión del pez león en dos localidades del Caribe (SA Caribe occidental y SM Caribe sur) a partir de dos marcadores moleculares, el primero consistió en un análisis de la región control mitocondrial de 432 individuos, el cual no reveló cambios temporales en ambas localidades, aunque se detectó la presencia del haplotipo H3 en un individuo en SA, lo cual obedece a una baja frecuencia de esta información. Se elaboraron y estandarizaron 10 *loci* tipo microsatélites que se amplificaron en 364 individuos, el análisis mostró un déficit de heterocigotos, lo cual puede estar relacionado con efectos de endogamia y deriva génica. El estudio reveló que la invasión se encuentra estructurada por seis stocks genéticamente diferentes ($K = 6$) de los cuales se encontraron cuatro en SA y cinco en SM, lo cual concuerda con variaciones espaciales y temporales relacionadas a diferencias en las tasas de reclutamiento de los individuos colonizadores de cada localidad.

Palabras clave: Evento fundador, *Pterois volitans*, endogamia, deriva génica, invasiones biológicas, región control mitocondrial, microsatélites.

Abstract

The lion fish *Pterois volitans* has invaded the western Atlantic causing a serious decline in the recruitment of reef fish, affecting population's competitors and non-competitors of all sizes, which has altered the complexity of the food web and reef stability. This invasion is a priority issue because of the potential impact caused on the environment and the socio-economic sector, for which the application of all scientific tools is urgent. In this study the temporal dynamics of the genetic diversity of the invasion of lionfish in two locations of the Caribbean (SA Western and Caribbean SM southern Caribbean) from two molecular markers was evaluated, the first was an analysis of the mitochondrial control region of 432 subjects, which revealed no temporal changes in both locations, although the presence of H3 haplotype was detected in an individual in SA, which is due to a low frequency of this information. 10 microsatellite *loci* were developed and standardized in 364 subjects, the analysis showed a deficit of heterozygotes, which may be related to effects of inbreeding and genetic drift. The study revealed that the invasion is structured by six different genetic stocks ($K = 6$) of which were found four in SA and five in SM, which is consistent with spatial and temporal variations related to differences in rates of recruitment of the colonizers of each locality.

Key words: Founder event, *Pterois volitans*, inbreeding, genetic drift, biological invasions, mitochondrial control region, microsatellites.

Contenido

	Pág.
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Materiales y métodos	5
3.1 Área de estudio.....	5
3.2 Toma de muestras	5
3.3 Extracción de material genético	6
3.4 Análisis de la región control mitocondrial (D-loop).....	6
3.5 Diseño, amplificación y análisis de <i>loci</i> tipo microsatélites	7
4. Resultados.....	11
4.1 Mitocondria	11
4.2 Diversidad mitocondrial y dinámica temporal.....	11
4.3 Grado de estructuración mitocondrial	14
4.4 Microsatélites	16
4.5 Variabilidad genética total	16
4.6 Diferenciación entre localidades e individuos	18
4.7 Dinámica temporal de la variabilidad y estructura poblacional por localidad	19
5. Discusión de resultados	25
5.1 Variabilidad genética mitocondrial.....	25
5.2 El efecto fundador, deriva y la reducción genética nuclear	28
6. Conclusiones y recomendaciones.....	31
6.1 Conclusiones.....	31
6.2 Recomendaciones	31

1. Introducción

El pez león (*Pterois volitans* Linnaeus 1758) nativo del Indo-Pacífico ha invadido los ecosistemas marinos del Atlántico occidental de manera incontrolada, fue reportado por primera vez en 1985 en Dania (Florida) por un pescador de langosta (Morris y Akins 2009), luego fue visto nuevamente en Bahía Biscayne en 1992 debido a la ruptura de un acuario por el efecto del huracán Andrew, aunque aparentemente ya habitaba otras localidades en Florida (Courtenay 1995), a pesar de no existir reportes del pez león por casi una década, en el año 2000 fue reportado en toda la costa de la Florida extendiéndose hacia el Norte hasta New York posiblemente como consecuencia de la Corriente del Golfo, en 2004 la invasión ocupó todas las localidades de Norte América incluyendo Bermuda y Bahamas siendo controlado por la baja temperatura del agua hacia el Norte (Schofield 2009).

El pez león no logró cruzar la barrera de la Corriente del Golfo hasta 2005 cuando se reportó en la isla de Cuba evento que ha sido relacionado con el efecto de la fuerte temporada de huracanes (Johnston y Purkis 2015). Una vez que fue reportado en Cuba la invasión se extendió sin control a tal punto que se han registraron 450 individuos por hectárea en 2007 (Morris y Whitfield 2009), ocupando diversos ecosistemas marinos del Caribe y Atlántico Occidental (Whitfield et al. 2007; Arbeláez y Acero 2011; Martínez-Viloria et al. 2011) hasta ser reportado al sur de Brasil en 2015 (Ferreira et al. 2015). El éxito invasivo del pez león se atribuye principalmente a características biológicas de la especie como larvas planctónicas (Freshwater et al. 2009, Morris y Whitfield 2009, Ahrenholz y Morris 2010), espinas ponzoñosas defensivas y escasos depredadores (Darling et al. 2011); coloración, forma, comportamiento críptico y estrategias de captura que lo hacen un depredador eficaz (Albins y Hixon 2008, Morris y Whitfield 2009), sumado a una alta tasa de crecimiento y madurez sexual (Morris y Whitfield 2009; Albins y Hixon 2013).

La invasión de *P. volitans* ha sufrido dos reducciones en la variabilidad genética, la primera en su introducción al Atlántico occidental en Norte América obteniendo 9 haplotipos en la región D-loop (Freshwater et al. 2009) y 3 haplotipos en la región cyt b (Hamner et al. 2007). La segunda

reducción genética fue causada por la dispersión de la población invasora hacia el sur, lo cual trae como consecuencia que la población del Caribe esté compuesta por 4 haplotipos (H1-H4) (Betancur et al. 2011, Toledo-Hernández et al. 2014, Butterfield et al. 2015), de los cuales solo 3 (H1, H2 y H4) fueron registrados en SA y SM en los individuos colonizadores en el periodo de 2009 (Betancur et al. 2011). Debido a que se cuenta con el material genético de individuos de una serie de 4 años partiendo de los fundadores en 2009 correspondiente a dos localidades del Caribe colombiano, se tiene el escenario ideal para investigar las variaciones en las frecuencias génicas en el tiempo, así como efectos de deriva y flujo genético partiendo de un momento inicial en poblaciones invasoras.

Este tipo de invasiones biológicas son una de las mayores causas de alteración de los ecosistemas, cambio global y pérdida de la biodiversidad mediado por las actividades humanas (Mack et al. 2000), particularmente *P. volitans* ha sido catalogado como una problemática medioambiental prioritaria para los ecosistemas marinos del Atlántico occidental, debido al potencial impacto que puede generar sobre el ecosistema (Albins y Hixon 2008, Albins y Hixon 2013, Sutherland 2010, Darling et al. 2011, Arias-González et al. 2011, Green et al. 2012) y el sector socioeconómico (Pimentel et al. 2005), por lo cual este trabajo pretende evaluar ¿Cómo cambia la diversidad genética en términos de variabilidad y estructura del pez león luego de un evento fundador en regiones insulares (San Andrés Islas SA, Caribe Occidental) y continentales (Santa Marta SM, Caribe Sur) del Caribe colombiano en una serie de 4 años?, desde dos escalas evolutivas diferentes a partir del análisis de secuencias de ADN mitocondrial y 10 *loci* tipo microsatélites específicos desarrollados *de novo* para esta especie.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la variación genética en el tiempo de las poblaciones invasoras de *Pterois volitans* afectadas por evento fundador en las localidades de San Andrés y Providencia (Caribe occidental) y Santa Marta (Caribe sur).

2.2 Objetivos específicos

- Establecer la variación temporal de la variabilidad genética a partir de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares (mtDNA y microsatélites) en las poblaciones de *P. volitans* en el Caribe occidental y en el Caribe sur en un periodo de cuatro años, partiendo de muestras obtenidas en el momento inicial de la invasión (t_0).
- Desarrollar cebadores específicos para la amplificación de *loci* tipo microsatélite del pez león como herramienta para la comprensión de la invasión.
- Evaluar posibles cambios temporales en la diversidad genética dentro de dos localidades relativamente aisladas (Caribe occidental y Caribe sur).
- Comparar la variabilidad genética del pez león en Colombia con otras poblaciones de peces invasoras globalmente.

3. Materiales y métodos

3.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó en el archipiélago de San Andrés y Providencia (SA) el cual se encuentra ubicado en el Caribe occidental entre los paralelos 12° y 16° N y los meridianos 78° y 82° W (IGAC, 1986). La isla de San Andrés es la de mayor tamaño, bordeando la isla se pueden encontrar parches arrecifales y en el costado oriental un arrecife de barrera parcialmente emergido. La isla de Providencia es de origen volcánico y se encuentra ubicada a 75 Km de San Andrés (13° 17' N y 81° 25' W), la plataforma insular tiene un área de 290 km² que consta de un arrecife de barrera parcialmente emergido sobre el costado oriental, en donde se desarrollan parches lagunares, arrecifes franjeantes y pináculos arrecifales (Prahl y Erhart 1985). También se estudió el área marina de Santa Marta y el PNN Tayrona, la cual se encuentra en la costa continental de Colombia en el Caribe sur, ubicada en la ecorregión Tayrona (11°20' N y 74°08' W). La región está sometida a un régimen bimodal anual de lluvias influenciado por los vientos alisios provenientes del noreste que causan fenómenos de surgencia (Franco-Herrera 2005). El fondo marino consta de pendientes marcadas debido a la prolongación en el fondo marino de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, donde se dan las condiciones ambientales aptas para el desarrollo de parches arrecifales.

3.2 Toma de muestras

Para la evaluación de la variación en las frecuencias genéticas de *P. volitans*, se emplearon los "fin clips" obtenidos de individuos capturados con ayuda de arpón mecánico y equipo SCUBA durante el periodo 2009-2012 en varias localidades del archipiélago de San Andrés y Providencia (Caribe occidental) y Santa Marta (Caribe sur). Las muestras correspondientes a SA en 2010 fueron facilitadas por la fundación Ecohamlet con sede en la isla de Providencia. Todas las muestras se preservaron en etanol 95 % a -5 °C y fueron depositadas temporalmente en el Centro de Estudios en Ciencias del Mar (CECIMAR) para análisis adicionales.

3.3 Extracción de material genético

Para la obtención de material genético se utilizó el proceso conocido como *salting-out* (Miller *et al.*, 1988) en el cual se dispuso una porción de 3 mm² a la cual se le realizó una lisis de membrana en 300 µL de solución de SDS 2 % y 1 µL de proteinasa K incubándola durante seis horas a 65 °C en un vial de 1.5 mL. La precipitación de material proteico se llevó a cabo adicionando 500 µL de solución de NaCl 5 M y se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Luego se tomaron 500 µL de sobrenadante, se adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico (IPA) y se llevó a -20 °C durante 12 horas. Con el fin de obtener el ADN y eliminar residuos de sales se realizaron dos centrifugados a 13000 rpm, uno inicial en IPA y otro en etanol 70 % para conservar finalmente en buffer TE (Tris EDTA-HCl). El total de material genético obtenido se comprobó en gel de agarosa al 2 % y se visualizó en un transiluminador UV Biorad ®.

3.4 Análisis de la región control mitocondrial (D-loop)

La diversidad genética mitocondrial del pez león se obtuvo a partir del análisis de una región de 662 bp correspondiente a la región control (D-loop), la reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µL de una mezcla de 2,5 µL de buffer (X), 1 µL de MgCl₂ (50 mmol L⁻¹), 1 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹), 0,5 µL de cada cebador (0,3 mmol L⁻¹) (Freshwater *et al.* 2009) (Tabla 1), Taq polimerasa 0,5 µL (5 U) y 2 µL de ADN (50–100 ng mL⁻¹). El protocolo de PCR se realizó en un termociclador ESCO Swift TM Max Pro comenzando con una denaturación de 5 min a 94 °C para continuar con 30 ciclos de 0,5 min a 94 °C, un alineamiento de 0,5 min a 45 °C y una extensión de 0,5 min a 72 °C, terminando con una extensión final de 5 min a 72 °C y una conservación a 4 °C. Los productos obtenidos se purificaron y secuenciaron en Macrogen Inc.

Las secuencias se editaron y alinearon usando el modelo Cluscal W (Larkin *et al.* 2007) por medio del software MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013), adicionalmente se realizó una inspección visual. Se determinó la composición de bases nitrogenadas, cantidad de sitios polimórficos (S), diversidad de haplotipos (Hd) (Nei 1987), diversidad de nucleótidos (π) (Nei 1987) y número medio de diferencias de nucleótidos (k) (Tajima 1989) por medio del software DnaSP 5 (Librado y Rozas

2009) y se construyó un mapa de haplotipos para resumir la frecuencia y distribución de haplotipos generada a partir de Arlequin 3.1.1 (Excoffier et al. 2005) en Network (Bandelt et al. 1999).

La estructura genética basada en la región control del ADN mitocondrial se obtuvo a partir de un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) y una comparación pareada de Fis (Excoffier et al. 1992). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos de las secuencias de la región control se obtuvo a partir del empleo del software Modeltest 3.06 (Posada y Crandall 1998) y Arlequin 3.1.1 (Excoffier et al. 2005). El análisis de AMOVA se llevó a cabo en cada área de estudio (San Andrés, SA, y Santa Marta, SM) y subdivida por periodos de tiempo (2009, 2010, 2011 y 2012) con el fin de evidenciar cambios en la estructura genética mitocondrial de la población y a nivel global para identificar relaciones entre áreas. Para minimizar homologías artificiales entre los haplotipos (homoplasias) durante la alineación se llevó a cabo una penalización de 20 vacíos para la apertura y 5 para la extensión aplicadas según lo propuesto por Sivasundar et al. (2001).

3.5 Diseño, amplificación y análisis de *loci* tipo microsatélites

Debido a la ausencia de cebadores específicos para amplificación de *loci* tipo microsatélites para el pez león *Pterois volitans* en el momento de proponer esta investigación, se construyó una librería genómica “*shotgun*” para la especie y se secuenció con la tecnología 454 GS-FLX basada en el principio de pirosecuenciación. Para la síntesis de los cebadores a analizar se tuvo en cuenta el motivo de repetición, características como el porcentaje G-C, el peso molecular, la temperatura de hibridación entre oligonucleótido *forward* y *reverse*, así como la diferencia entre ambos (ΔT_m). Se estandarizaron un total de 16 microsatélites de los cuales se analizaron 10 en la población estudio (Tabla 1), como complemento a los 18 *loci* propuestos por Schultz et al. (2013).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de región control mitocondrial y *loci* tipo microsatélites del pez león.

<i>Locus</i>	Tipo ¹		Primer (5' - 3')	T alineam. (°C)	Tamaño (pb)
PE1	AAATT	F	TGACCGTAAGTTTTGACAGCG	60	247 - 312
		R	TCGACTTCACACTTGGTGGG	60	247 - 312
PE2	ATATT	F	TTCTGTTCTCCCATAGTATGCACC	60	249 - 314
		R	CACGAAAAGCAGCTGTAGGG	60	249 - 314
PE4	AACAC	F	CTGCTCCTGAGTGTTACCCG	54	142 - 187
		R	CGTGGTTCAGTTTCACAGTGC	54	142 - 187
PE7	ATCTT	F	TCCTGAATTTCCCTCTGGG	54	90 -125

		R	CTATTCATGCAGAATGCGCC	54	90 -125
--	--	---	----------------------	----	---------

Tabla 1. (Continuación)

<i>Locus</i>	Tipo¹		Primer (5' - 3')	T alineam. (°C)	Tamaño (pb)
PE8	ATCTT	F	CCACTGCGTGTCAATTTCTCC	54	121 - 166
		R	GGATGTGAGGCTTGGTGAGG	54	121 - 166
TET6	ATGG	F	CATCTGTCCGTCTCTGAACCC	54	240 - 272
		R	CTTACCTTGCAGGTGGCTCC	54	240 - 272
TRI1	ATT	F	GGCTGCTGAAGCAGAAATCC	54	125 - 158
		R	GACATGCCCACTCACATTGG	54	125 - 158
TRI2	ATT	F	GGCCACTCTGCACAAATACG	54	215 - 245
		R	GCTGCAGGTATTCAGAGCCC	54	215 - 245
TRI3	TCC	F	CATGCTCTGTCCGGAGTACG	54	216 - 249
		R	CACGGTTAAATACCGCCACC	54	216 - 249
TRI6	AGT	F	CAATATCAGTTAAATGCACTCACAACC	54	174 - 198
		R	GAGGCATTGCACACCTTACG	54	174 - 198
Lion A-H		H	CCA TCT TAA CAT CTT CAG TG	50	760
Lion B-L		L	CAT ATC AAT ATG ATC TCA GTAC	50	760

¹(F: *Forward*), (R: *Reverse*)

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 10 uL con 2 µL de buffer (X), 0,4 µL de MgCl₂ (50 mmol L⁻¹), 0,2 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹), 0,2 µL de cada cebador (0,3 mmol L⁻¹), Taq polimerasa 0,2 µL (5 U) y 2 µL de ADN (50–100 ng mL⁻¹). El termociclado consistió en 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 0,5 min a 95 °C, 0,5 min a temperatura de alineamiento (Tabla 1), 0,5 min a 72 °C, extensión final de 10 min a 72 °C y preservación a 4 °C. Los productos obtenidos de la amplificación, se observaron por electroforesis capilar QIAxcel Advance (QIAGEN), utilizando kits de alta resolución (High Resolution Kit QIAGEN) y un marcador de peso con concentraciones de ADN conocidas (DNA Size Marker 50-800 v2.0). El tamaño de cada amplificado se determinó con el programa QIAxcel ScreenGel v1.0, el cual permite cuantificar el peso de cada banda, determinando el tamaño de los alelos y distinguiendo entre los individuos homocigotos de los heterocigotos.

Fueron detectados alelos nulos a través de software Micro-Cheker (Van Oosterhout et al. 2004). En cada localidad y año se determinó el número de alelos por locus (N_a), heterocigosidad observada

(H_o) y heterocigosidad esperada (H_e), por medio del software GenAlex 6.0 (Peakall y Smouse 2006), se calculó el coeficiente de endogamia (F_{is}) por *loci* en FSTAT (Goudet 2001). Las diferencias del test de Hardy-Weinberg se calcularon usando el test análogo de Fisher así como la segregación independiente de genotipos (Guo y Thompson 1992), esta prueba tiene como hipótesis nula la unión aleatoria de gametos estimada con series de permutaciones Markov Chain Monte Carlo (MCMC), 10,000 batches/1000 interacciones) generadas a partir de Genepop (Raymond y Rousset 2003). La estructura genética a partir de microsatélites se obtuvo mediante el software Arlequín 2000 (Schneider et al. 2000) calculando el valor F_{st} (Weir y Cockerham 1984) se realizó la comparación entre periodos de tiempo para cada localidad en particular por medio de un AMOVA y un procedimiento no paramétrico de 10.000 permutaciones aleatorias que tiene como hipótesis nula que no existe estructuración genética entre las poblaciones. Para determinar la variación en las agrupaciones genéticamente similares de individuos entre áreas y tiempo se realizó un análisis Bayesiano por medio del software Structure 2.3.3 (Hubisz et al. 2009). Para determinar el número de poblaciones (K) $K= 1-11$ se usó una modificación del método propuesto por Evanno et al. (2005), empleando 750.000 MCMC con un periodo de "burn-in" de 100.000 y 20 interacciones, obtenido a partir del software Structure Harvester 0.56.3 (Earl 2009).

4. Resultados

4.1 Mitochondria

Con el fin de analizar el cambio de la diversidad y estructura genética del pez león se obtuvieron un total de 432 secuencias de la región control del ADN mitocondrial con un tamaño de 662 pb, de las cuales 155 pertenecían al Caribe occidental y 277 al Caribe sur entre los años 2009 y 2012. Las secuencias correspondientes al periodo 2009 pertenecen al estudio publicado por Betancur et al. (2011).

4.2 Diversidad mitocondrial y dinámica temporal

El análisis mitocondrial generó un total de cuatro haplotipos con ocho sitios polimórficos, una diversidad de haplotipos (H_d) de 0,516, diversidad de nucleótidos (π) de 0,00293 y número medio de diferencias de nucleótidos (k) de 1,941. La diversidad de haplotipos fue mayor en SA (0,527) que en SM (0,508), mientras que la diversidad de nucleótidos y el número medio de diferencias de nucleótidos fue menor en SA (0,00270 y 1,847) que en SM (0,00300 y 1,987) (Tabla 2).

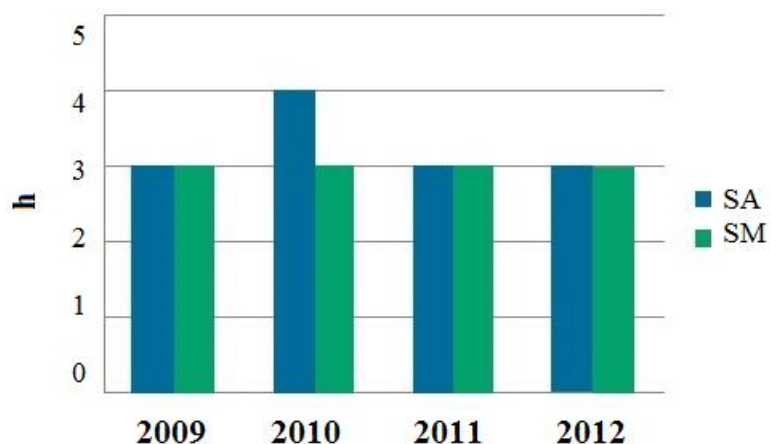
Tabla 2. Índices de variabilidad genética obtenida por área de estudio y año, número de individuos (n), diversidad de haplotipos (H_d), diversidad de nucleótidos (π) y número medio de diferencias de nucleótidos (k).

	n	h	H_d	π	k
SA 2009	47*	3	0,555	0,00290	1,980
SA 2010	34	4	0,497	0,00270	1,840
SA 2011	37	3	0,527	0,00260	1,720
SA 2012	37	3	0,535	0,00280	1,880
SA Total	155	4	0,527	0,00270	1,847

Tabla 2. (Continuación)

	n	h	Hd	π	k
SM 2009	166*	3	0,520	0,00315	2,087
SM 2010	36	3	0,557	0,00315	2,086
SM 2011	38	3	0,482	0,00280	1,856
SM 2012	37	3	0,456	0,00250	1,658
SM Total	277	3	0,508	0,00300	1,987
TOTAL	432	4	0,516	0,00293	1,941

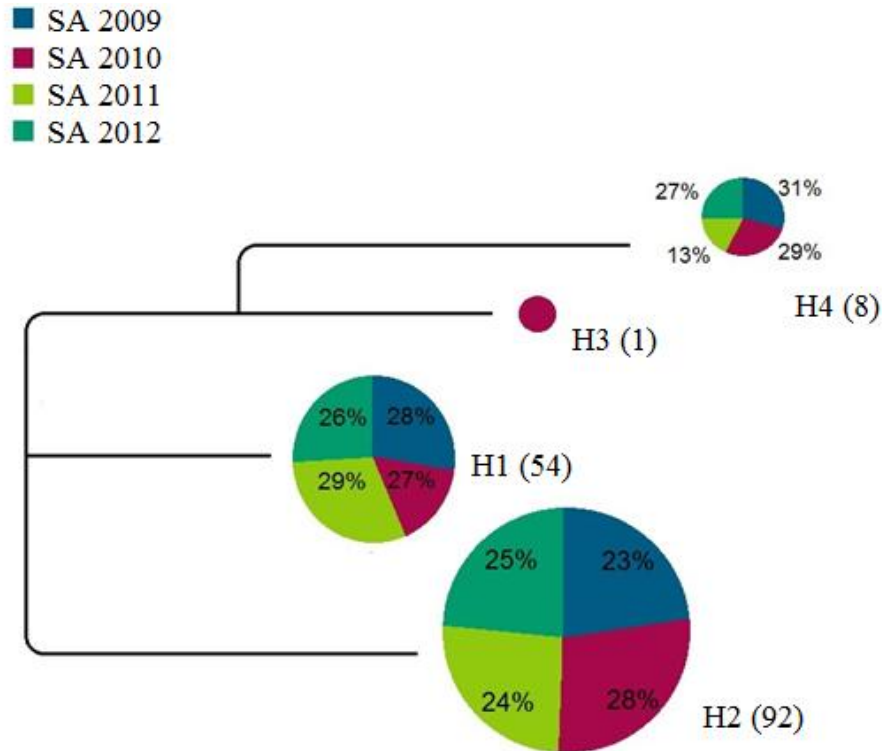
Los datos revelan que no existe relación significativa entre el cambio de la diversidad haplotípica y el tiempo (Figura 1), en SA la variabilidad genética se mantiene en el tiempo sin evidenciar cambios a lo largo del estudio, lo cual puede estar relacionado con escaso flujo génico desde el norte y ausencia de la deriva génica al igual que en la localidad de SM, donde este flujo no es evidente aunque los índices de variabilidad genética tienden a disminuir.

Figura 1. Variación del número de haplotipos h en el tiempo en cada localidad.

En total se identificó la presencia de cuatro haplotipos en SA de los cuales un único individuo correspondió al haplotipo 3 (H3) siendo el menos frecuente (Figura 2). El haplotipo más frecuente, H2 (n=92, 59,4 %), no presentó cambios en las frecuencias en relación con los cuatro periodos de estudio (2009-2012). H1 fue el siguiente en frecuencia total, 34,8 % (n=54), y mostró un cambio

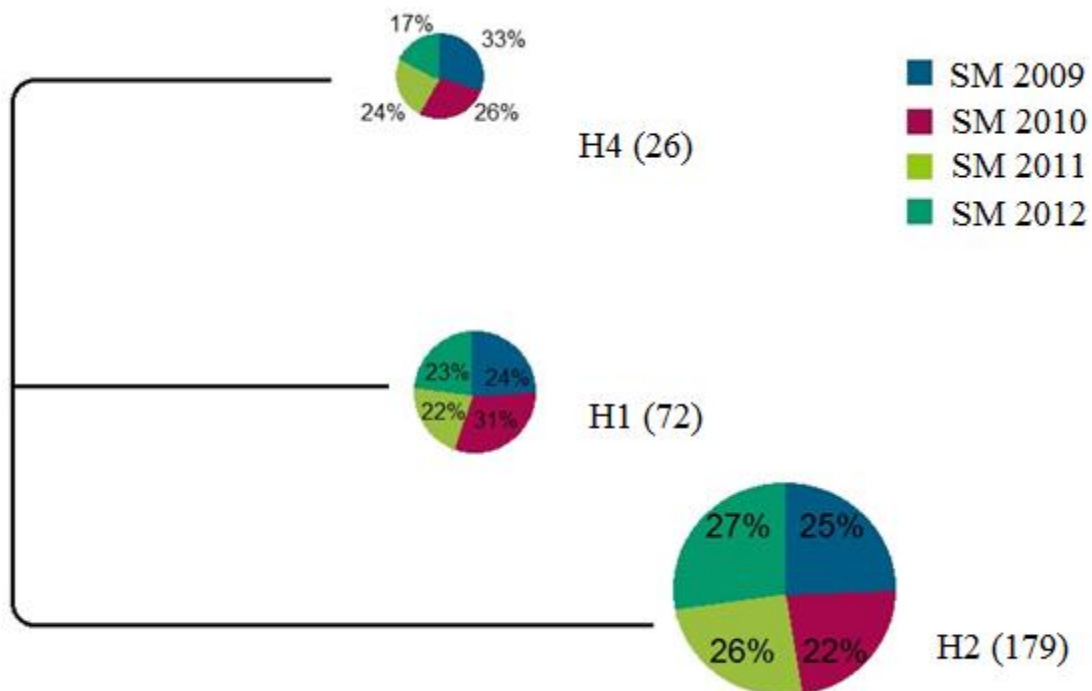
leve de 2009 a 2010, aunque aumenta nuevamente en los periodos siguientes. H4 obtuvo una frecuencia relativa total de 5,2 % (n=8) siendo el menos frecuente después de H3.

Figura 2. Red de haplotipos obtenida para el archipiélago de San Andrés y Providencia.



Para el área de SM se determinó la presencia de tres haplotipos donde nuevamente el H2 fue el más frecuente con 64,6 % (n=179) y no presentó cambio drástico en la frecuencia por año. H1 se mantuvo estable durante el periodo evaluado con una frecuencia relativa de 26 % (n=72), aunque muestra un aumento en 2010. Por otro lado, el haplotipo menos frecuente, H4 (9,4 % n=26), disminuyó su frecuencia de 33 % en 2009 a 17 % en 2012 (Figura 3).

Figura 3. Red de haplotipos obtenida para Santa Marta por año, porcentaje y número de individuos.



4.3 Grado de estructuración mitocondrial

Para identificar relaciones entre la composición genética de los diferentes periodos y áreas de estudio se realizó una comparación pareada de F_{st} , el mejor modelo de sustitución nucleotídica encontrada fue KHY. No se encontró diferencia significativa en ninguna de las comparaciones, aunque se observa que el nivel de estructuración aumenta en el tiempo. Con el fin de identificar diferencias entre áreas y años así como entre toda la población evaluada se realizó un análisis AMOVA, donde no se encontró estructuración en la población total ($F_{st} = -0,00231$, $P = 0,76833 + 0,01530$, variación 100,23 %), así como divergencia entre SA y SM ($F_{ct} = -0,00904$, $P = 0,04985 + 0,00554$, variación 0,9 %) al igual que entre áreas por año ($F_{sc} = -0,01146$, $P = 0,91887 + 0,00514$, variación -1,14 %) (Tabla 3).

Tabla 3. AMOVA mitocondrial entre años y localidades (SA y SM).

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	% variación
Entre grupos (SA y SM)	1	1,993	0,0088	0,9
Entre poblaciones dentro cada grupo por año (2009, 2010, 2011, 2012)	6	2,776	-0,01106	-1,14
Dentro de poblaciones	424	413,611	0,9755	100,23
Total	431	418,38	0,97324	
Fst = -0,00231, Valor p = 0,76833 ± 0,01530				
Fct = -0,00904, Valor p = 0,04985 ± 0,00554				
Fsc = -0,01146, Valor p = 0,91887 ± 0,00514				

El AMOVA temporal y espacial no reveló diferencias en la información genética al interior de cada localidad, aunque en SA la diferencia fue levemente mayor con $F_{st} = -0,01248$ y una variación del 1,25 % (Tabla 4) en comparación con SM en el donde se obtuvo $F_{st} = -0,01051$ y una variación de 1,05 % (Tabla 5), lo cual sugiere una diferenciación entre años de la población en cada localidad (Figura 4).

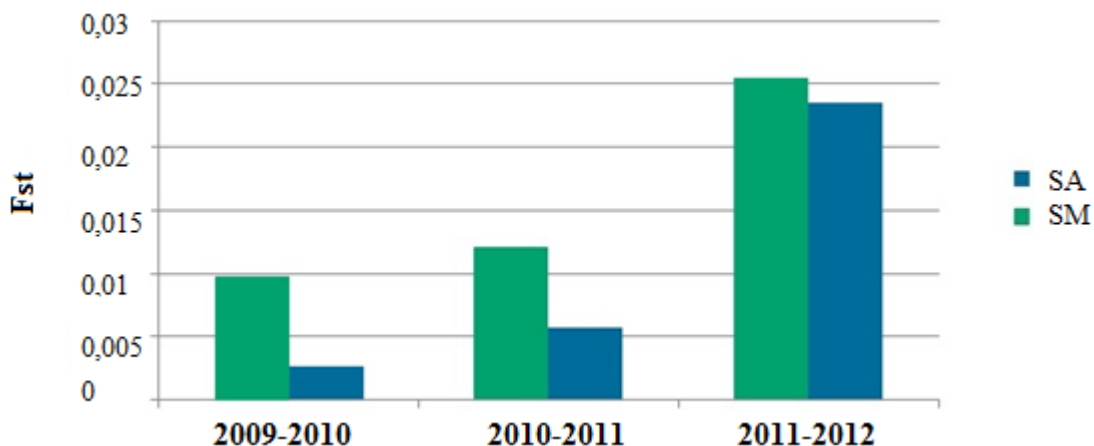
Tabla 1. AMOVA mitocondrial entre años en la localidad de SA.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	% variación
Entre años	3	1,468	-0,01148	-1,25
Dentro de cada año	151	140,738	0,93204	101,25
Total	154	142,206	0,92506	
Fst = -0,01248				
Valor p = 0,77126 ± 0,01224				

Tabla 2. AMOVA mitocondrial entre años en la localidad de SM.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	% variación
Entre años	3	1,308	-0,01039	-1,05
Dentro de cada año	273	272,873	0,99953	101,05
Total	276	274,181	0,98914	
Fst = -0,01051				
Valor p = 0,84164 ± 0,01182				

Figura 4. Variación en la estructuración genética (F_{st}) por periodo de tiempo en cada localidad.



4.4 Microsatélites

A partir de la construcción de la librería genómica “*shotgun*” para *P. volitans* y la pirosecuenciación con la tecnología 454 GS-FLX, se obtuvo un total de 310.678 lecturas (*reads*) crudas, 147.875.502 bases secuenciadas y 7259 ensamblajes (*contigs*) mayores a 100 pb correspondientes a 4'643.966. De las 64.265 lecturas que contenían secuencias microsatélites, 38.475 permitieron el diseño *de novo* de cebadores potencialmente amplificables, de los cuales se analizaron 10 (5 tipo penta nucleótido, 4 tipo tri nucleótido y 1 tipo tetra nucleótido) en el presente estudio, 9.611 correspondían a microsatélites compuestos y 5.663 a microsatélites interrumpidos (Tabla 1).

4.5 Variabilidad genética total

Con el fin de analizar con mayor detalle la diversidad, estructura y variación temporal de la población del pez león en dos localidades del Caribe colombiano (SA y SM) se analizaron un total de 364 individuos en 10 *loci* tipo microsatélites con un total de 108 alelos, de los cuales 11 correspondieron a alelos privados (cuatro pertenecientes a la localidad de SA y siete a SM, los alelos privados mostraron baja frecuencia siendo el mayor TE6 en 2012 y PE4 en 2010 con valores de 0,068 y 0,050 respectivamente (Tabla 6). Ninguno de los *loci* se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) $p < 0.05$ según el test exacto de Guo y Thompson (1992) (Tabla 7).

La H_o total fue aproximadamente la mitad que la H_e con un índice de endogamia de 0,606. Los *loci* más polimórficos fueron PE1 y PE2 con 14 alelos, en todos los casos la heterocigosidad observada (H_o) fue menor a la heterocigosidad esperada (H_e), los *loci* tipo penta nucleótidos presentaron la mayor H_o siendo mayor en PE2 y PE8 (0,709 y 0,670 respectivamente) aunque muy por debajo de la H_e ; hay que destacar los menores valores encontrados para los *loci* TR1, TR2, TR3 y TE6 (0,029; 0,037; 0,097 y 0,098 respectivamente) que están relacionados con procesos de endogamia en la población siendo evidente en el locus TR6 donde no se encontraron individuos heterocigotos (Tabla 6).

Tabla 6. Alelos privados encontrados en cada localidad por año de muestreo.

Población	Locus	Alelo	Frecuencia
SA 2010	PE4	147	0,050
SA 2011	PE1	247	0,010
SA 2012	PE8	161	0,011
SA 2012	TE6	240	0,068
SM 2009	PE1	312	0,026
SM 2009	TR3	249	0,013
SM 2010	PE7	90	0,010
SM 2010	TR2	245	0,022
SM 2010	TR6	198	0,022
SM 2011	TE6	272	0,010
SM 2012	TR1	158	0,011

Tabla 7. Índices de variabilidad genética por locus, número de alelos (N_a), heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) e índice de endocruzamiento (F_{is}).

Locus	N_a	H_o	H_e	F_{is}	H-W
PE1	14	0,322	0,719	0,534	P<0,0001
PE2	14	0,709	0,878	0,181	P<0,0001
PE4	10	0,596	0,775	0,220	P<0,0001
PE8	10	0,670	0,815	0,169	P<0,0001
PE7	8	0,377	0,605	0,353	P<0,0001
TE6	9	0,098	0,639	0,843	P<0,0001

TR1	11	0,029	0,592	0,954	P<0,0001
------------	----	-------	-------	-------	----------

Tabla 7. (Continuación)

<i>Locus</i>	Na	Ho	He	Fis	H-W
TR2	11	0,037	0,656	0,947	P<0,0001
TR3	12	0,097	0,694	0,863	P<0,0001
TR6	9	0,000	0,610	1,000	P<0,0001
Total	108	0,293 ± 0,031	0,698 ± 0,015	0,606 ± 0,039	P<0,0001

4.6 Diferenciación entre localidades e individuos

El AMOVA espacial mostró un grado moderado de estructuración en la población con F_{st} de 0,09964, la cual es producto de una baja variabilidad del 0,4 % entre localidades (SA y SM), aunque cada población mostró ser diferente en cada periodo evaluado con una variación del 90,04 % (Tabla 8), teniendo como referencia la escala propuesta por Wright (1949), quien afirma que valores entre 0 y 0,05 indican una baja diferenciación genética, entre 0,05 y 0,15 indican una moderada diferenciación, entre 0,15 y 0,20 indican una alta diferenciación y valores por encima de 0,25 indican una gran diferenciación genética, por lo cual los datos obtenidos pueden indicar una alta fidelidad de los fundadores al área colonizada en relación con la estructuración de la información genética en el tiempo producto de diferencias en la tasas de reclutamiento de los componentes de la población.

Tabla 3. AMOVA del grado de estructuración poblacional entre SA y SM.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	% variación
Entre grupos (SA y SM)	1	23,704	-0,01065	-0,4
Entre años 2009, 2010, 2011, 2012	6	164,538	0,27552	10,36
Dentro de poblaciones	720	1723,326	2,39351	90,04
Total	727	1911,567	2,65838	
$F_{st} = 0,09964$, Valor $p = 0,0000 \pm 0,0000$				
$F_{sc} = 0,10323$, Valor $p = 0,0000 \pm 0,0000$				

$$F_{ct} = -0,00400, \text{ Valor } p = 0,6363 \pm 0,0153$$

4.7 Dinámica temporal de la variabilidad y estructura poblacional por localidad

Al analizar los cambios temporales en la variabilidad genética se evidenció que ninguno de los demes se ajustó al equilibrio de HW debido a un déficit en la H_o en todos los periodos evaluados según el test exacto de Guo y Thompson (1992), en 2010 llega a ser hasta la tercera parte de la H_e en ambas localidades (Tabla 9). En total el exceso de homocigotos es cerca del doble de lo esperado para la población, con un índice de endogamia de 0,606. En el área de SA se observó un leve aumento en la diversidad génica de la población hasta 2011 cuando tiende a disminuir nuevamente aunque los cambios en N_a y H_o no fueron significativos en relación al tiempo (Figura 5 y 6), los datos de endocruzamiento fueron altos variando entre 0,565 y 0,649, lo cual puede ser efecto del evento fundador y deriva génica. En el área de SM no se evidenciaron relaciones significativas entre el tiempo, el N_a y la H_o , mostrando cambios leves entre 2009 y 2010 con una disminución de 0,312 a 0,242 en la H_o para aumentar nuevamente hasta el año 2012 (0,326) (Figura 5 y 6). Los valores de endogamia encontrados fueron altos y se encontraron entre 0,544 en 2009 y 0,692 en 2010 (Tabla 9). No se encontró evidencia de desequilibrio de ligación por lo cual se puede asegurar una independencia estadística de los *loci* analizados.

Figura 5. Variación temporal del N_a en el área por localidad (SA, $P=0,5762$ y SM, $P=1$).

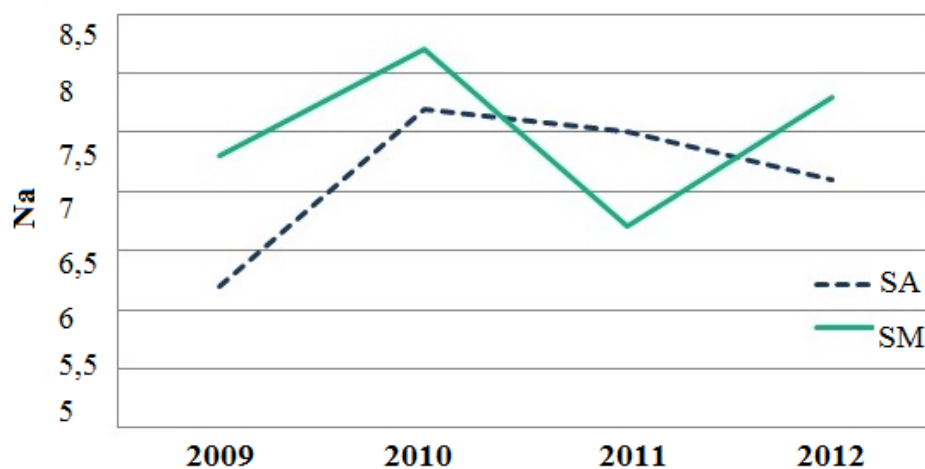
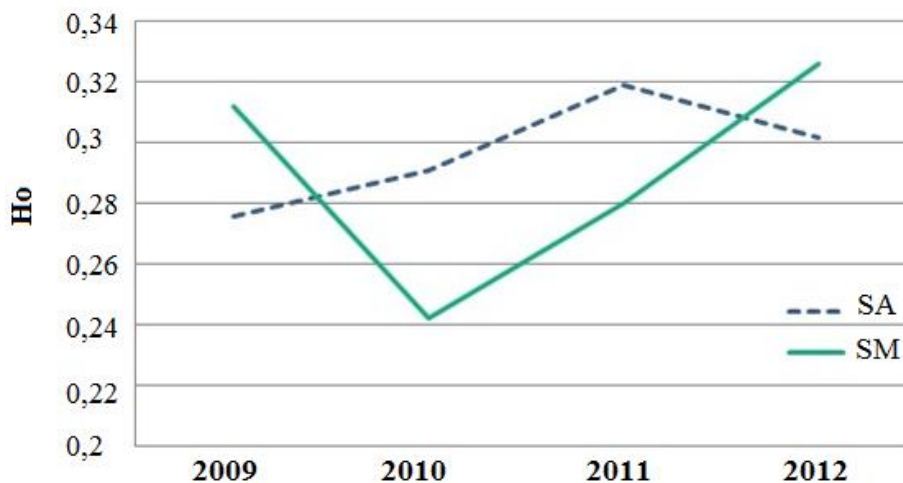


Figura 6. Variación temporal del H_o por localidad (SA, $P=0,9811$ y SM, $P=0,9857$).**Tabla 4.** Variación temporal por localidad de la variabilidad genética y endocruzamiento.

	N	H_o	H_e	F	H-W
SA 2009	42	0,276	0,655	0,649	$P<0,0001$
SA 2010	41	0,291	0,732	0,634	$P<0,0001$
SA 2011	49	0,319	0,645	0,565	$P<0,0001$
SA 2012	45	0,302	0,660	0,585	$P<0,0001$
Total SA	177	$0,297 \pm 0,045$	$0,673 \pm 0,024$	$0,608 \pm 0,056$	$P<0,0001$
SM 2009	41	0,312	0,686	0,544	$P<0,0001$
SM 2010	48	0,242	0,762	0,692	$P<0,0001$
SM 2011	50	0,280	0,700	0,611	$P<0,0001$
SM 2012	48	0,326	0,746	0,572	$P<0,0001$
Total SM	187	$0,289 \pm 0,043$	$0,723 \pm 0,016$	$0,605 \pm 0,055$	$P<0,0001$
Total	364	$0,293 \pm 0,031$	$0,698 \pm 0,015$	$0,606 \pm 0,039$	$P<0,0001$

Al realizar la comparación pareada del grado de diferenciación por año en SA se observa una estructuración moderada que tiende a disminuir al pasar el tiempo con valores de 0,16379 entre 2009 y 2010 para llegar a 0,10230 entre 2009 y 2012 (Tabla 10), el mismo patrón se observa entre

las comparaciones de los demás periodos lo cual puede indicar una homogenización del "pool" genético en relación al flujo génico.

Tabla 5. Comparación pareada de F_{st} entre periodos de estudio en el área de SA, grado de significancia encima de la diagonal.

	2009	2010	2011	2012
2009		0,00000 \pm 0,0000	0,00000 \pm 0,0000	0,00000 \pm 0,0000
2010	0,16379		0,00000 \pm 0,0000	0,00000 \pm 0,0000
2011	0,14632	0,05003		0,00000 \pm 0,0000
2012	0,10230	0,11842	0,06338	

Con el fin de determinar diferencias entre periodos de tiempo se realizó un AMOVA el cual mostró un grado de estructuración moderado entre años ($F_{st} = 0,10350$), con un porcentaje de variación de 10,35 %. Al evaluar los miembros al interior de cada año y en toda la población se observó una mayor diferencia con un porcentaje de variación de 36,0 % ($F_{it} = 0,46349$) y 53,65 % ($F_{is} = 0,40155$) respectivamente (Tabla 11). Aunque la distancia genética tiende a disminuir la estructuración sigue siendo moderada lo cual puede sugerir un flujo génico en bajo grado de poblaciones fuente del norte del Caribe.

Tabla 6. AMOVA del grado de estructuración entre años en el área de SA.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	% variación
Entre poblaciones 2009 a 2012	3	68,508	0,22724	10,35
Entre individuos en poblaciones	173	477,269	0,79041	36
Entre individuos	177	208,5	1,17797	53,65
Total	353	754,277	2,19561	
$F_{st} = 0,10350$, Valor p = 0,0000 \pm 0,0000				
$F_{it} = -0,46349$, Valor p = 0,0000 \pm 0,0000				
$F_{is} = 0,40155$ P. value = 0,0000 \pm 0,0000				

En la localidad de SM la dinámica en la variabilidad genética del pez león es similar a la encontrada para SA, aunque las diferencias son menores al evaluar la distancia genética entre los individuos por año. La distancia encontrada entre años fue baja y se observa claramente una homogenización de la población con valores de distancia entre 2009 y 2010 de 0,17713 disminuyendo hasta 0,05801 entre 2009 y 2012 (Tabla 12), lo cual es consistente con los datos de diferenciación arrojados por el AMOVA que estima una diferenciación de tan solo 9,8 % entre años, aunque los datos entre individuos en cada año fueron mayores con 48,04 % de diferencia y 42,16 % entre todos los individuos, lo cual puede ser explicado con un aislamiento relativo de SM que posibilita una homogenización de la información genética en relación a la endogamia y la deriva génica (Tabla 13).

Tabla 7. Comparación pareada de Fst entre periodos de estudio en el área de SM, grado de significancia encima de la diagonal.

	2009	2010	2011	2012
2009		0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000
2010	0,17713		0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000
2011	0,07628	0,15201		0,01802 ± 0,0121
2012	0,05801	0,12036	0,01643	

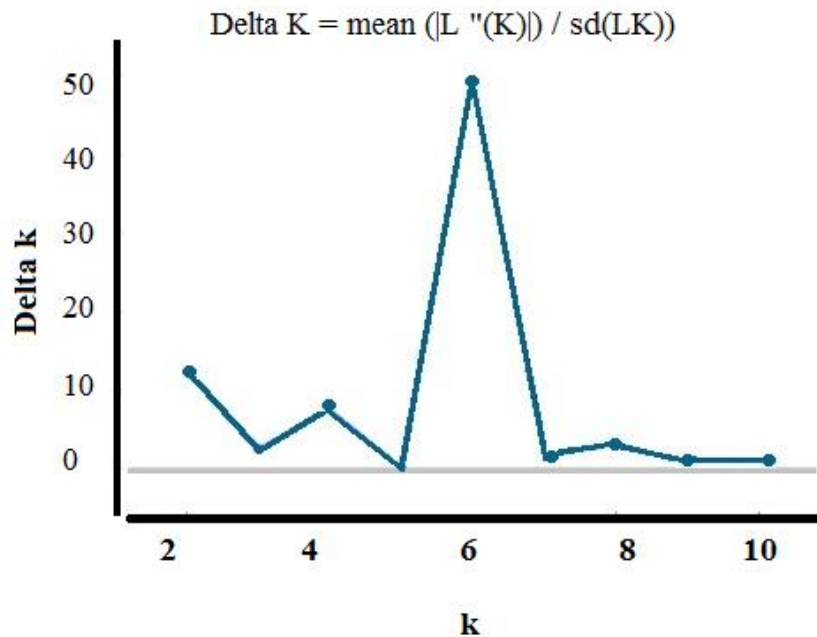
Tabla 8. AMOVA del grado de estructuración entre años en el área de SM.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	% variación
Entre poblaciones 2009 a 2012	3	99,147	0,3076	9,8
Entre individuos en poblaciones	183	794,181	1,50813	48,04
Entre individuos	187	247,5	1,32353	42,16
Total	373	1140,829	3,13926	
Fst = 0,09798 P. value = 0,0000 ± 0,0000				
Fit = 0,57839 P. value = 0,0000 ± 0,0000				
Fis = 0,53260 P. value = 0,0000 ± 0,0000				

Cuando los genotipos de los 364 individuos, teniendo en cuenta los periodos y localidad de procedencia, fueron analizados para estimar el número de poblaciones genéticamente homogéneas (K), se pudo identificar a través del método propuesto por Evanno (2005) la presencia de seis

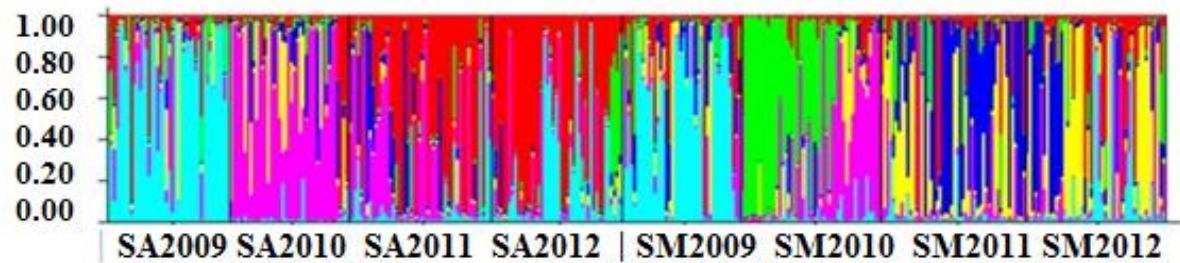
clúster o poblaciones genéticamente diferentes ($K=6$) (Figura 7), de los cuales se encontraron cuatro en la localidad de SA y cinco en SM (Figura 8).

Figura 7. Valores del Delta K según la corrección de Evanno *et al.* (2005) mostrando el mayor valor para $K=6$.



Estos seis cluster se distribuyeron de forma asimétrica en el tiempo en ambas localidades, en SA se observó la presencia de tres clusters principalmente representados por el color azul claro, púrpura y rojo, de los cuales el primero dominó en el inicio de la invasión (2009), para ser sustituido en 2010 por el cluster púrpura, observando una transición entre 2011 y 2012 en la cual se hace más frecuente el cluster rojo, no obstante, se da una reaparición del cluster azul claro, lo cual puede ser consistente con una dinámica poblacional de tipo auge y caída que puede estar relacionada con diferencias en las tasas de reclutamiento de cada agrupación genética en particular y efectos de deriva génica. En la localidad de SM se encontraron cinco cluster principalmente (Azul claro y oscuro, verde, púrpura y amarillo) donde el azul claro constituyó el más frecuente al igual que en la localidad de SA obedeciendo a la identidad genética de los individuos colonizadores, luego en 2010 la invasión es dominada por el cluster verde y púrpura, seguido de un cambio en 2011 donde aparecen un cluster azul oscuro y amarillo lo cual resulta en una mezcla de los anteriores en 2012 (Figura 8).

Figura 8. Bar-plot con el más alto valor para Delta K (K=6), cada individuo está representado por una barra vertical cuyo color indica el coeficiente de parentesco a cada uno de los cluster.



5. Discusión de resultados

5.1 Variabilidad genética mitocondrial

Los cambios en la variabilidad genética en poblaciones naturales se pueden dar por diferentes razones. Por un lado, el cambio en la información genética es un proceso lento relacionado con la biología de la especie, el tamaño efectivo de la población, acumulación de mutaciones y divergencia (Sawyer y Hart 1992), aunque en poblaciones conectadas el flujo genético puede aportar información a la población afectada (Vilá et al. 2003) a tal punto que existen poblaciones introducidas que poseen mayor variabilidad genética que las poblaciones nativas (Kolbe et al. 2004, Lindholm et al. 2005). Por otro lado la variabilidad genética puede verse reducida por un efecto fundador, deriva, procesos reproductivos y selección natural, afectando el *fitnes* de la población (Frankham 1995, Luikart et al. 1998, Reed y Frankham 2003, Willi et al. 2006), teniendo en cuenta que en la medida que una población posea mayor variación genética tiene mejor capacidad adaptativa ante fenómenos ambientales (Lande 1988, Reed y Frankham 2003, Frankham 2005). Los resultados de esta investigación evidencian la baja variabilidad genética mitocondrial que poseen las poblaciones del pez león en las localidades de SA y SM en relación con la población fuente del Indopacífico (Freshwater et al. 2009), lo cual puede estar afectando su potencial adaptativo, dada la depresión por endogamia y el efecto de la deriva génica, estos procesos son más evidentes en el área de SM que en SA, lo cual puede estar indicando un subsidio de información desde la población fuente del norte para el área del Caribe occidental (SA) y un posible aislamiento genético del Caribe sur (SM), aunque no es evidente algún tipo de estructuración mitocondrial entre localidades.

La variabilidad genética mitocondrial encontrada en la población del pez león de SA y SM mostró estar constituida por los haplotipos H1 y H2 principalmente y H4 en menor proporción, lo cual concuerda con lo registrado por Betancur et al. (2011) para 2009 debido al efecto fundador

producido por la dispersión genética hacia el Caribe desde la población fuente constituida por nueve haplotipos en Norte América, recalcando la disminución drástica en la variabilidad haplotípica producto de la introducción en el Atlántico desde la población nativa del Indopacífico (Tabla 14) (Freshwater et al. 2009). Se registró la presencia de H3 en un individuo correspondiente a SA (Isla de Providencia) en marzo de 2010, aunque no se encontró nuevamente en SA y no tuvo representantes en SM en ninguno de los periodos evaluados. Esto puede estar relacionado con flujo de información genética desde el norte, teniendo en cuenta que isla de Providencia se encuentra al norte de SA y que este haplotipo había sido registrado únicamente para un individuo de Grand Cayman en 2008 (Betancur et al. 2011), un ejemplar en el sur de Puerto Rico en 2011 (Toledo-Hernández et al. 2014) y un individuo de Colón (Panamá) en mayo de 2013 (Tabla 14) (Butterfield et al. 2015). Lo anterior obedece a la presencia de esta información pero en una frecuencia baja y la posibilidad de existir información no identificada. La diversidad genética mitocondrial para SA y SM fue aproximadamente la mitad de la registrada en la población nativa (Hamner et al. 2007, Freshwater et al. 2009, Betancur et al. 2011), aunque fue la mayor registrada para el Caribe, lo cual puede estar relacionado con flujo genético y el periodo de colecta (Tabla 14). Esta tendencia es constante en todas las localidades del Caribe, donde se observan tan solo cuatro haplotipos (H1-H4), con una Hd entre 0,320 en Bonaire (Caribe sur) y 0,630 en Honduras (Caribe noroccidental) en relación con las poblaciones nativas de Indonesia (0,962) y Filipinas (0,886). Esto es corroborado en los índices de π y k . Vale la pena resaltar que en Honduras se obtuvieron los mayores valores de variabilidad, lo cual puede estar relacionado con el periodo de colecta ya que los individuos corresponden a 2013, por lo cual el flujo génico ha tenido mayor oportunidad de modificar la información de la población. Esta afirmación es congruente con los datos obtenidos para SA en 2012 (0,535, Tabla 2) y para Bonaire donde se obtuvieron los menores valores de variabilidad genética, teniendo en cuenta que esta es la localidad ubicada más al sur y que las muestras corresponden al periodo inicial de la invasión (2009) (Tabla 14). Al analizar el cambio en la variabilidad por año se observa un patrón de homogenización de la población donde los haplotipos más frecuentes aumentan en el tiempo y viceversa con los haplotipos menos frecuentes. Esto es evidente para el H4 en la localidad de SM el cual tiende a disminuir en el tiempo, el mismo patrón se observa en SA aunque en el periodo de 2011 existe un aumento en la diversidad probablemente causado por el flujo génico que modifica las frecuencias haplotípicas de forma asimétrica (Dias et al. 1996, Haag et al. 2006).

Tabla 9. Diversidad genética del pez león en la población invasora por localidad, número de individuos (n), diversidad de haplotipos (Hd), diversidad de nucleótidos (π) y número medio de diferencias de nucleótidos (k).

	n	h	Hd	π	k	Fecha
Indonesia ³	42	26	0,962	0,0129	8,74	2004
Filipinas ³	28	12	0,886	0,0150	10,17	2004
Honduras ²	15	3	0,630	0,0037	2,53	may-13
San Andrés Islas	155	4	0,527	0,0027	1,85	2009-2012
Santa Marta	277	3	0,508	0,0030	1,99	2009-2012
Belice ²	59	3	0,490	0,0025	1,72	Marzo-octubre 2009
Puerto Rico ³	138	4	0,450	0,0022	1,49	Febrero-marzo 2012
Gran Cayman ¹	79	4	0,430	0,0021	1,41	2007-2008
Panamá ²	5	2	0,400	0,0030	2,00	may-13
Cuba ²	24	3	0,400	0,0022	1,46	Enero-febrero 2013
Jamaica ²	37	3	0,400	0,0022	1,49	ago-11
Virgins Islands ²	10	3	0,380	0,0025	1,71	abr-09
Bonaire ²	21	2	0,320	0,0014	0,97	jun-09

¹Betancur et al. (2011), ²Butterfield et al. (2015), ³Freshwater et al. (2009).

Aunque la invasión del pez león ha sido satisfactoria en todo el ambiente del Caribe debido a que posee en su biología las herramientas para subsistir y reproducirse en un amplio ámbito de ambientes tropicales y subtropicales del Atlántico occidental, este estudio permite afirmar que las poblaciones del pez león de SA y SM se encuentran afectadas por un evento fundador y deriva génica, lo cual ha reducido la variabilidad genética drásticamente. De no registrarse nuevos eventos de introducción de información en la población del Caribe, las poblaciones no poseen la información genética necesaria para enfrentar alguna presión ambiental en el futuro teniendo en cuenta la endogamia, la expresión de alelos deletéreos y la deriva génica (Lande 1988, Meunier et al. 2001).

5.2 El efecto fundador, deriva y la reducción genética nuclear

El análisis de 10 *loci* tipo microsatélites nucleares permitió evidenciar con mayor detalle el escenario genético en el que se encuentran las poblaciones de SA y SM, los análisis nucleares muestran un exceso de homocigotos; en general el efecto fundador ha llevado al declive en la variación genética hasta el punto que los valores encontrados representan aproximadamente la mitad ($H_o = 0,293$; $H_e = 0,698$) en comparación con poblaciones invasoras de peces a nivel global (Tabla 15). La invasión reveló estar compuesta por seis cluster genéticamente diferentes siendo SM la localidad con mayor variabilidad lo cual puede estar relacionado con la llegada de invasores de diferentes rutas ya que la costa de SM se encuentra conectada por medio de corrientes y litoral continental a la localidad fuente, en contraste SA al ser insular oceánica la probabilidad de llegada de diferente material genético disminuye, la dinámica temporal de estos cluster fue consistente con un escenario tipo auge y caída relacionados con diferencias en las tasas de reclutamiento, el evento fundador y la deriva genética (Rius et al. 2014) al no encontrar información genética estable en el tiempo.

Con el fin de generar un punto de referencia genético del estado actual de la invasión del pez león en relación a otros eventos invasivos se compararon los datos encontrados con poblaciones de peces nativas e invasoras a nivel global, de las seis especies evaluadas, tanto en la población nativa como en la población invasora, presentaron mayor diversidad genética que la población del pez león en la localidad de SA y SM, en algunos casos hasta tres veces mayor (Tabla 15). Este escenario muestra la reducción crítica a la que se ha visto sometido la población del pez león en Colombia, desde un punto de vista adaptativo no cuenta con variación genética que le permita enfrentar una presión ambiental específica, por lo cual su éxito depende de características biológicas y de presiones ambientales aleatorias. Vale la pena resaltar que aunque no se poseen los datos nucleares para las poblaciones nativas del Índico y Pacífico o de poblaciones invasoras de Norte América, es evidente el déficit de heterocigotos al relacionarlo con el promedio registrado para especies de peces marinos, $H_o = 0,79$ y dulceacuícolas, $H_o = 0,46$ (DeWoody y Avise 2000) lo cual se relaciona con los datos del índice F_{is} (0.606), confirmando la presencia de un alto grado de endocruzamiento en ambas localidades (Tabla 5). Este escenario puede generar pérdida de heterocigosis, expresión de alelos deletéreos y podría explicar la presencia de un pez león que no presentó evidencia de espinas ponzoñosas (Torres-Rodríguez et al. en preparación).

Este estudio muestra el escenario genético al que se ve enfrentado el pez león en dos localidades del territorio marino de Colombia, obedeciendo a la paradoja de la genética de la conservación donde poblaciones introducidas poseen una baja variabilidad genética producto del efecto fundador (Roman y Darling 2007, Sax et al. 2007, Bax et al. 2003, Badii y Landeros 2007, Briggs 2007, Briggs 2013). Se resalta que los datos de la invasión del pez león confirman dos eventos de este tipo, una reducción en la información genética al momento de llegar al Atlántico y una al llegar al Caribe.

Tal vez sea imposible erradicar en su totalidad las poblaciones del pez león de los ambientes marinos del Atlántico, debido a su tolerancia y adaptabilidad al medio. Aunque hay que tener en cuenta que en el crecimiento exponencial de la población debe existir una fase asintótica debido al agotamiento de uno o varios recursos, y las poblaciones de *P. volitans* en cada localidad no son ajenas a esta premisa. Por lo tanto, a pesar de la amplia gama de herramientas biológicas que tienen a lo largo de su ciclo de vida, poseen en sus genes la información del autocontrol, bastando con la presión ambiental necesaria que afecte los genotipos indicados para que la falta de variabilidad conlleve a la disminución del tamaño de la población.

Tabla 10. Relación de variabilidad genética de poblaciones de peces invasoras y nativas a nivel global, número de individuos (N), heterocigosidad observada (Ho) y heterocigosidad esperada (He).

Nombre común	Nombre científico	Localidad	N	Ho	He	Referencia
Pez León	<i>Pterois volitans</i>	San Andrés Islas	177	0,297 ± 0,045	0,673 ± 0,024	Presente estudio
Pez León	<i>Pterois volitans</i>	Santa Marta	187	0,289 ± 0,043	0,723 ± 0,016	Presente estudio
Pez León	<i>Pterois volitans</i>	Colombia	177	0,293 ± 0,031	0,698 ± 0,015	Presente estudio
Grouper	<i>Cephalopholis argus</i>	Nativo, Taiaro, Polinesia francesa	50	0,0385	0,0460	Planes y Legaillon, 1998
Grouper	<i>Cephalopholis argus</i>	Introducido, Hawaii	25	0,0385	0,0447	Planes y Legaillon, 1998
Snapper	<i>Lutjanus kasmira</i>	Nativo, Marquesas	39	0,0849	0,8530	Planes y Legaillon, 1998
Snapper	<i>Lutjanus kasmira</i>	Introducido, Hawaii	72	0,0729	0,0750	Planes y Legaillon, 1998
Guppie	<i>Poecilia reticulata</i>	Nativo Guyana	85	0,7100	0,6800	Lindholm et al., 2005
Guppie	<i>Poecilia reticulata</i>	introducido Australia	42	0,6100	0,6400	Lindholm et al., 2005
Guppie	<i>Poecilia reticulata</i>	Nativo Trinidad y Tobago	50	0,3300	0,3397	Barson et al., 2009
Aristotle's catfish	<i>Silurus aristotelis</i>	Nativo, Trichondia	30	0,6980	0,7340	Triantafyllidis et al., 2002
Aristotle's catfish	<i>Silurus aristotelis</i>	Introducido, Volvi	30	0,7030	0,7310	Triantafyllidis et al., 2002

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La población del pez león en las localidades estudiadas no ha presentado cambios en la estructura temporal y espacial desde un punto de vista mitocondrial. Se desarrollaron y probaron 10 marcadores moleculares tipo microsatélites específicos para el estudio de la invasión del pez león, siendo éste el primer estudio en mostrar la estructura poblacional del mismo.

La variabilidad genética del *Pterois volitans* desde un punto de vista nuclear es baja en SA y SM, presentando un déficit de heterocigosidad producto del efecto fundador y la endogamia. La población del pez león en SA y SM está estructurada por 6 stocks genéticos, lo cual constituye un punto de partida para la comprensión de la invasión a una mayor escala. Dicha invasión en Colombia es menos variable genéticamente comparada con otras poblaciones invasoras a nivel global debido principalmente a que en este caso no se han registrado múltiples eventos de introducción.

6.2 Recomendaciones

Es urgente la aplicación de los marcadores moleculares desarrollados en este estudio en todo el ámbito geográfico y temporal de la invasión de *P. volitans*. Igualmente, es conveniente realizar estudios particulares en cada área invadida teniendo en cuenta barreras geográficas relacionadas con el flujo génico de esta especie.

La implementación de un plan de monitoreo genético podría ofrecer información sobre la dinámica de la estructuración y variabilidad de cada localidad en particular, permitiendo ofrecer herramientas para el control y manejo de la problemática

Bibliografía

- Ahrenholz DW y Morris J.A. 2010. Larval duration of the lionfish, *Pterois volitans* along the Bahamian Archipelago. *Environmental Biology of Fishes*, 88: 305-309.
- Albins MA y Hixon MA. 2008. Invasive Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce recruitment of Atlantic coral-reef fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 367: 233-238.
- Albins MA y Hixon MA. 2013. Worst case scenario: potential long-term effects of invasive predatory lionfish (*Pterois volitans*) on Atlantic and Caribbean coral-reef communities. *Environmental Biology of Fishes*, 96: 1151-1157.
- Arbeláez N, y Acero A. 2011. Presencia del pez león *Pterois volitans* (Linnaeus) en el manglar de la bahía de Chengue, Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 40 (2): 431-435.
- Arias-González JE, González-Gándara JC, Cabrera JL y Christensen V. 2011. Predicted impact of the invasive lionfish *Pterois volitans* on the food web of a Caribbean coral reef. *Environmental Research*, 111 (7): 917-925.
- Badii MH y Landeros J. 2007. Invasión de especies o el tercer jinete de Apocalipsis ambiental. *International Journal of Good Conscience*, 2(1): 39-53.
- Bandelt HJ, Forster P y Röhl A .1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1): 37-48.
- Barson NJ, Cable J, y Van Oosterhout C. 2009. Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (*Poecilia reticulata*) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source-sink metapopulation structure, founder events and population bottlenecks. *Journal of Evolutionary Biology*, 22 (3): 485-497.
- Bax N, Williamson A, Agüero M, Gonzalez E y Geeves W. 2003. Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity. *Marine policy*, 27 (4): 313-323.
- Betancur R, Hines A, Acero A, Ortí G, Wilbur AE y Freshwater DW. 2011. Reconstructing the lionfish invasion: insights into Greater Caribbean biogeography. *Journal of Biogeography*, 38 (7): 1281-1293.

- Briggs JC. 2007. Marine biogeography and ecology: invasions and introductions. *Journal of Biogeography*, 34 (2): 193-198.
- Briggs JC. 2013. Invasion ecology: origin and biodiversity effects. *Environmental Skeptics and Critics*, 2 (3), 73-81.
- Butterfield JS, Díaz-Ferguson E, Silliman BR, Saunders JW, Buddo D, Mignucci-Giannoni A y Hunter ME. 2015. Wide-ranging phylogeographic structure of invasive red lionfish in the Western Atlantic and Greater Caribbean. *Marine Biology*, 162 (4): 773-781.
- Courtenay WR. 1995. Marine fish introductions in southeastern Florida. *American Fisheries Society Introduced Fish Section Newsletter*, 14 (1): 2-3.
- Darling ES, Green SJ, O'Leary JK y Côte IM. 2011. Indo-Pacific lionfish are larger and more abundant on invaded reefs: a comparison of Kenyan and Bahamian lionfish populations. *Biological Invasions* 13 (9): 2045-2051.
- DeWoody JA y Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56 (3): 461-473.
- Dias P, Verheyen GR y Raymond M. 1996. Source-sink populations in Mediterranean blue tits: evidence using single locus minisatellite probes. *Journal of Evolutionary Biology*. 9 (6): 965-978.
- Earl DA. 2009. Structure Harvester v0. 3. [Internet]. 05 de Enero de 2016. Disponible en: <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest>.
- Excoffier L, Smouse PE y Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 (2): 479-491.
- Excoffier L, Laval G y Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47-50.
- Evanno G, Regnaut S y Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14 (8): 2611-2620.
- Ferreira CE, Luiz OJ, Floeter SR, Lucena MB, Barbosa MC, Rocha CR y Rocha LA. 2015. First record of invasive lionfish (*Pterois volitans*) for the Brazilian coast. *PLoS ONE*, 10(2): 1-5.
- Franco-Herrera A. 2005. Oceanografía de la ensenada de Gaira: el Rodadero, más que un centro turístico en el Caribe Colombiano, Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. p. 56.
- Frankham R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29 (1): 305-327.

- Frankham R. 2005. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 94: 385.
- Freshwater DW, Hines A, Parham S, Wilbur AE, Sabaoun M, Woodhead J, Akins JL, Purdy B, Whitfield PE y Paris CB. 2009. Mitochondrial control region sequence analyses indicate dispersal from the US East Coast as the source of the invasive Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* in the Bahamas. *Marine Biology*, 156: 1213-1221.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3). Lausanne University, Lausanne, Switzerland.
- Green SJ, Akins JL, Maljković A y Côté IM. 2012. Invasive lionfish drive Atlantic coral reef fish declines. *PloS one*, 7 (3):1-3.
- Guo SW y Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48 (2): 361-372.
- Haag CR, Riek M, Hottinger JW, Pajunen VI y Ebert D. 2006. Founder events as determinants of within-island and among-island genetic structure of *Daphnia* metapopulations. *Heredity*, 96 (2): 150-158.
- Hamner RM, Freshwater DW y Whitfield PE. 2007. Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder events in the western Atlantic. *Journal of Fish Biology* 71: 214-222.
- Holland BS. 2001. Invasion without a bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L). *Marine Biotechnology*, 3 (5): 407-415.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, y Pritchard JK. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9 (5): 1322-1332.
- IGAC. 1986. San Andrés y Providencia. Aspectos Geográficos. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá. 156 p.
- Johnston MW, y Purkis SJ. 2015. Hurricanes accelerated the Florida–Bahamas lionfish invasion. *Global change biology*, 21 (6): 2249-2260.
- Kolbe JJ, Richard E, Glor RE, Rodríguez-Schettino L, Chamizo-Lara A, Larson A y Losos JB. 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431, 177-181.
- Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241 (4872), 1455-1460.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H y Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.

- Librado P y Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
- Lindholm AK, Breden F, Alexander HJ, Chan WK, Thakurta SG. y Brooks R. 2005. Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Molecular Ecology*, 14: 3671-3682.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM y Allendorf FW. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*, 7(8): 963-974.
- Martínez-Viloria H, Gómez ÁR y Acero A. 2011. Presencia del pez león, *Pterois volitans* (Actinopterygii: Scorpaenidae) en el Departamento de la Guajira, Mar Caribe de Colombia. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 40 (2): 445-447.
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale MW, Evans H, Clout M y Bazzaz F. 2000. Invasiones Biológicas: Causas, Epidemiología, Consecuencias globales y Control. *Tópicos en Ecología*. 5:1-19.
- Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Bargues MD, Mas-Coma S y Renaud F. 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, 10 (5):1333-1340.
- Miller SA, Dykes DD y Polesky H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16 (3): 1215.
- Morris JA y Akins JL. 2009. Feeding ecology of the invasive lionfish in the Bahamian archipelago. *Environmental Biology of Fishes*. 86: 389-398.
- Morris JA y Whitfield PE. 2009. Biology, Ecology, Control and Management of the Invasive Indo-Pacific Lionfish: An Updated Integrated Assessment. NOAA Techn. Mem. NOS NCCOS 99. 57 pp.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press New York 512.
- O'reilly PT, Canino MF, Bailey KM y Bentzen P. 2004. Inverse relationship between F_{ST} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. *Molecular Ecology*, 13(7): 1799-1814.
- Peakall RO y Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6 (1): 288-295.

- Planes S y Lecaillon G. 1998. Consequences of the founder effect in the genetic structure of introduced island coral reef fish populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63 (4):537-552.
- Pimentel D, Zuñiga R y Morrison D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*. 52: 273-288.
- Posada D y Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.
- Prahl H y Erhardt H. 1985. Colombia: Corales y arrecifes coralinos. FEN Colombia. Fondo para la protección y medio ambiente “José Celestino Mutis”. Bogotá.
- Raymond M y Rousset F. 2003. A population genetic software for exact test and ecumenicism: GENEPOP, version 3.4. *Heredity*, 68: 248-249.
- Reed DH y Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. 17: 230-237.
- Rius M, Turon X, Bernardi G, Volckaert FA y Viard F. 2015. Marine invasion genetics: from spatio-temporal patterns to evolutionary outcomes. *Biological Invasions*, 17 (3): 869-885.
- Roman J y Darling JA. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22 (9): 454-464.
- Sawyer SA y Hartl DL. 1992. Population genetics of polymorphism and divergence. *Genetics*, 132 (4):1161-1176.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hastings A, Holt RD, Mayfield MM, Mary I, O'Connor MI y Rice WR. 2007. Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22 (9): 465-471.
- Schneider S, Roessli D y Excoffier L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual version, 2: 2496-2497.
- Schofield PJ. 2009. Geographic extent and chronology of the invasion of non-native lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus 1758] and *P. miles* [Bennett 1828]) in the Western North Atlantic and Caribbean Sea. *Aquatic Invasions*, 4: 443–449.
- Schultz TF, Fitzpatrick CK, Freshwater DW y Morris JA. 2013. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from invasive lionfish (*Pterois volitans* and *P. miles*). *Conservation Genetics Resources*, 5 (3): 599-601.

-
- Sivasundar A, Bermingham E y Orti G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10 (2): 407-417.
- Sutherland WJ, Clout M, Côté IM, Daszak P, Depledge MH, Fellman L, Fleishman E, Garthwaite R, Gibbons DW, De Lurio J, Impey AJ, Lickorish F, Lindenmayer D, Madgwick J, Margerison C, Maynard T, Peck LP, Pretty J, Prior S, Redford KH, Scharlemann PW, Spalding M y Watkinson AR. 2010. A horizon scan of global conservation issues for 2010. *Cell Press*, 25: 1-7.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123 (3): 585-595.
- Tamura K, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski y Sudhir Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-2729.
- Toledo-Hernández C, Vélez-Zuazo X, Ruiz-Diaz CP, Patricio AR, Mège P, Navarro M y Papa R. 2014. Population ecology and genetics of the invasive lionfish in Puerto Rico. *Aquatic Invasions*, 9 (2): 227-237.
- Torres-Rodriguez JA, Gonzales-Corredor JD y Acero A. Registro de un ejemplar de pez león (*Pterois volitans*) sin vestigios de aleta dorsal espinosa. En preparación.
- Triantafyllidis A, Abatzopoulos TJ, Leonardos J y Guyomard R. (2002). Microsatellite analysis of the genetic population structure of native and translocated Aristotle's catfish (*Silurus aristotelis*). *Aquatic Living Resources*, 15 (06): 351-359.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP y Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4 (3): 535-538.
- Vila C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, Seddon J, Kojola I, Casulli A y Ellegren H. 2003. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 270 (1510): 91-97.
- Weir BS y Cockerham C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6): 1358-1370.
- Whitfield PE, Hare JA, David AW, Harter SL, Munoz RC y Addison CM. 2007. Abundance estimates of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans/miles* complex in the Western North Atlantic. *Biological Invasions*, 9: 53-64.

Willi Y, Van Buskirk J y Hoffmann AA. 2006. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 433-458.