



# El Colegio de la Frontera Sur

Caracterización genética del pez león en el Caribe  
noroccidental usando Inter Secuencias Simples Repetidas

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

**ELIZABETH LABASTIDA ESTRADA**

2014



## El Colegio de la Frontera Sur

Chetumal, Quintana Roo a 1 de diciembre de 2014

Las personas abajo firmantes, integrantes del jurado examinador de **Elizabeth Labastida Estrada**, hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada: **Caracterización genética del pez león en el Caribe noroccidental usando Inter Secuencias Simples Repetidas**, para obtener el grado de **Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural**.

	Nombre	Firma
Tutora	Dra. Salima Christine Machkour M'Rabet	_____
Asesor	Dr. Juan Jacobo Schmitter Soto	_____
Asesor	M. en C. María del Carmen García Rivas	_____
Sinodal Adicional	Dr. Yann Lucien Hénaut	_____
Sinodal Adicional	Dra. Carmen A. Villegas Sánchez	_____
Sinodal Suplente	Dr. David González Solís	_____

*“No podemos hablar de etapas sin presuponer una meta”, al parecer lo logramos*

JULIO CORTÁZAR-RAYUELA

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría. A mi tutora, la Dra. Salima Machkour M'Rabet, quien ha dirigido y apoyado este proyecto de tesis desde el primer momento. Agradezco también a los miembros de mi consejo tutelar, el Dr. Juan Jacobo Schmitter Soto y la M. en C. María del Carmen García Rivas por el apoyo académico y técnico durante la realización de este proyecto. Igualmente, al Dr. Yann Hénaut, al Dr. David González Solís y a la Dra. Carmen A. Villegas por la revisión del documento final, por sus aportaciones y comentarios para mejorar el escrito final.

Quiero agradecer al Biól. Óscar Álvarez Gil, director del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos, al Biól. Rodolfo Franco Gordillo y a la Sociedad Cooperativa Pesquera de Puerto Morelos S.C.L., por su apoyo para la recolecta de muestras de tejido en Puerto Morelos. En el mismo sentido agradezco a todos los técnicos de campo de la Reserva de la Biósfera de Banco Chinchorro, a los pescadores de las cooperativas Langosteros del Caribe y Banco Chinchorro por su ayuda en la captura de los peces. A los guardaparques del Parque Nacional Arrecifes de Xcalak agradezco todo el apoyo logístico y técnico para obtención de muestras en esa ANP.

Agradezco a la Dra. Nataly Castelblanco-Martínez y a Oceanic Society por las muestras proporcionadas de la Reserva Marina Atolón de Turneffe, Belice. A la M. en C. Dorka Cobián Rojas y al Acuario Nacional de Cuba, por la colaboración

para trabajar la parte genética del proyecto que realizan y a la Dra. Ximena Vélez-Zuazo, de la Universidad de Puerto Rico, por hacernos llegar muestras de dicho país.

Agradezco al Dr. Manuel Elías Gutiérrez y a la M. en C. Arely Martínez Arce por las facilidades otorgadas para el uso de algunos equipos de laboratorio de Código de barras. Asimismo, expreso mi agradecimiento a los académicos, técnicos y personas que directamente o indirectamente han intervenido en mi formación académica y en la construcción de este proyecto.

Muchas gracias a todos los que han estado en esos momentos que han implicado la construcción de este trabajo. Muchas gracias a Jorge Cruz y a Laura Cavanzón, el aprendizaje y las risas en el laboratorio no será lo mismo sin ustedes. A Tlaloc, Julio, Luz, Edgar, Isabel, Ashanti, Alex y Nicolás por haber coincidido y compartido este grato momentito de la vida.

Y muchísimas gracias a mi familia, a mi Mami, a Cherry y a mi papá, sé que ustedes siempre han confiado en mí, y me han motivado a seguir mis sueños, aunque esto implique estar lejos de ustedes...Los amo con todo el corazón

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 2 THE USE OF ISSR MARKERS FOR SPECIES DETERMINATION AND GENETIC STUDY OF THE INVASIVE LIONFISH IN GUANAHACABIBES, CUBA .....	7
ABSTRACT .....	10
RESUMEN.....	12
INTRODUCTION .....	13
MATERIAL AND METHODS.....	16
RESULTS .....	20
DISCUSSION .....	21
REFERENCES.....	25
TABLES AND FIGURES.....	32
CAPÍTULO 3 DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL PEZ LEÓN ( <i>Pterois volitans</i> ) EN EL CARIBE NOROCCIDENTAL, MEDIANTE INTER SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (ISSR).....	40
RESUMEN .....	41
INTRODUCCIÓN .....	43
MATERIALES Y MÉTODOS .....	49

Área de estudio.....	49
Recolecta de muestras .....	51
Extracción de DNA .....	52
Amplificación por PCR.....	53
Análisis de datos moleculares.....	54
RESULTADOS.....	58
Diversidad Genética .....	58
Estructura genética de las localidades.....	61
DISCUSIÓN .....	66
Diversidad genética de <i>P. volitans</i> en la región del Caribe noroccidental.....	66
Estructura poblacional de <i>P. volitans</i> en el Caribe noroccidental .....	70
LITERATURA CITADA.....	74
CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES GENERALES.....	88
LITERATURA ADICIONAL .....	92





# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

Después de la pérdida de hábitat, las especies invasoras son el segundo factor más importante que influye en la reducción de la biodiversidad (Fausch et al., 2001). Las invasiones biológicas se han extendido de manera importante en el medio marino: solo el 16% de las ecoregiones marinas en el mundo no han sido afectadas por la presencia de especies no nativas (Molnar et al., 2008).

Las especies invasoras poseen características biológicas que favorecen su dispersión y establecimiento como: tasas altas de reproducción, tiempos generacionales cortos y amplia capacidad de dispersión (Williams y Meffe, 2005). Conocer estas características es indispensable para el manejo y control de los procesos invasivos (Lee, 2002).

La investigación genética es un campo que permite analizar los procesos de invasión biológica (Lee, 2002). Sin embargo, solo una pequeña fracción de las invasiones biológicas reportadas a nivel mundial se ha investigado desde el punto de vista genético (Rius et al., 2014). El estudio genético de las especies invasoras puede determinar los patrones y procesos que contribuyen al éxito de las especies invasoras (Lawson y Estoup, 2011).

La taxonomía molecular se basa en el uso de técnicas moleculares para identificar o corroborar la clasificación de los organismos (Le Roux y Wiczorek, 2009). En ambientes acuáticos la identificación de los organismos a menudo resulta problemática por varias razones como: alta diversidad de especies, poca o nula

información taxonómica en las poblaciones fuente, introducciones múltiples, simpatría y taxones crípticos entre otros (Stepien y Tumeo, 2006). La correcta identificación taxonómica es el primer paso para adecuadas estrategias de control y manejo (Le Roux y Wieczorek, 2009).

La genética de poblaciones se enfoca en describir la cantidad y estructura de la variación genética dentro y entre poblaciones para entender los procesos evolutivos involucrados (Hufbauer, 2004). Las especies invasoras poseen características y procesos genéticos que pueden ser clave para establecerse exitosamente fuera de su rango nativo. La diversidad genética es un rasgo que puede contribuir al éxito de la invasión al proporcionar material esencial para la adaptación en respuesta a cambios ambientales (Badyaev y Martin, 2000; Pappert et al., 2000; Tsutsui et al., 2000).

Allendorf y Lundquist (2003) consideraron que tanto fuerzas evolutivas (selección natural y la deriva génica), como procesos genéticos (efecto fundador, cuello de botella, flujo génico) pueden influir en el éxito de las especies exóticas. En este sentido, Kristensen y Sorensen (2005) sugieren que no todos los efectos genéticos causados por una drástica reducción poblacional son negativos, por ejemplo posterior a un efecto fundador, los alelos deletéreos pueden ser purgados por selección en poblaciones endogámicas lo que aumenta su adecuación y por lo tanto la posibilidad de establecerse con éxito fuera de su rango nativo.

Sin embargo, en las primeras etapas de la invasión, la diversidad genética es reducida debido a cuellos de botella o efecto fundador (Sakai et al., 2001). Al respecto, Frankham (2005) plantea ¿cómo poblaciones con baja diversidad genética, por lo tanto con un bajo potencial evolutivo y una baja adecuación son poblaciones invasoras altamente exitosas?

Algunos autores sugieren que algunas soluciones a este dilema incluyen especies con altas tasas reproductivas, especies que purgan alelos deletéreos y especies con altas tasas de migración (Sakai et al., 2001; Frankham, 2005). Al respecto, estudios recientes han concluido que bajos niveles de diversidad genética no comprometen el establecimiento y dispersión de las especies invasoras (Dupont et al., 2007; Golani et al, 2007; Roman y Darling, 2007; Rius y Shenkar, 2012).

El pez león ofrece un excelente modelo para investigar los procesos genéticos que ocurren durante el transcurso de una invasión (Betancur-R. et al., 2011). Se ha documentado que tanto *Pterois volitans* (Linneo, 1758) como *P. miles* (Bennett, 1828 ambos Scorpaeniformes: Scorpaenidae) fueron sido introducidos en el Atlántico occidental; no obstante, *P. volitans* es más ubicuo y más abundante que *P. miles* y ha logrado establecerse a través del Mar Caribe hasta el Sur de Venezuela (Hamner et al., 2007; Freshwater et al., 2009).

En algunas zonas en las que el pez león se ha establecido existe incertidumbre sobre su identificación taxonómica. Tal es el caso de Cuba, en donde

no existe información sobre la genética de esta especie (Chevalier et al., 2013). En 2007, se registró el primer avistamiento confirmado de pez león en el norte de Cuba y dos localidades en la costa del Caribe. Los dos ejemplares colectados fueron identificados con base a los caracteres morfológicos como *P. volitans* (Schultz, 1986; Chevalier et al., 2008), sin embargo, ambas especies no son 100% distinguibles morfológicamente, lo cual precisa la validación usando herramientas moleculares.

Por otro lado, se han examinado los patrones de diversidad genética y estructura poblacional en algunas localidades donde el pez león se ha establecido. En la costa este de E.U.A. las poblaciones de *P. volitans* se caracterizaron por tener una baja diversidad genética debido a un fuerte efecto fundador (Hamner et al., 2007). En poblaciones del Atlántico occidental (costa este de E.U.A., Bahamas y Bermudas) y del Caribe (Isla Caimán, Nicaragua y Colombia) la diversidad genética es baja comparada con la de poblaciones de *Pterois* en su hábitat nativo (Betancur-R. et al., 2011).

Con respecto a la estructura poblacional, no se ha reportó diferenciación significativa entre las poblaciones de Bahamas y Carolina del Norte (Freshwater et al., 2009). En otro estudio, a pesar de la relativa homogeneidad genética de las seis poblaciones del Atlántico occidental, se reportó diferenciación entre las poblaciones de Bahamas y Bermudas y las poblaciones del Caribe (Betancur-R. et al., 2011). En Puerto Rico hay una diferenciación significativa entre las poblaciones de la costa

este y sur de la isla, lo que sugiere que la invasión probablemente comenzó con la dispersión de individuos o larvas desde la costa de Florida (Toledo et al., 2014).

En esta tesis se propuso analizar desde el punto de vista genético la invasión del pez león en la (México, Belice, Cuba y Puerto Rico) usando Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) como marcador molecular, con el fin de determinar si los individuos de *P. volitans* en las diferentes localidades son genéticamente homogéneos o si presentan estructura genética a esta escala. Estos marcadores tienen la ventaja de presentar altos porcentajes de polimorfismo, lo que permite obtener información fina sobre la variación genética de los individuos (Behura, 2006; Wink, 2006). Los objetivos del presente estudio fueron: 1) Evaluar la diversidad genética de la especie en la región del Caribe noroccidental y en cada localidad muestreada, 2) Determinar si existe diferenciación genética entre las localidades y establecer la estructura genética entre localidades y 3) Confirmar la especie de *Pterois* establecida en el Parque Nacional de Guanahacabibes, Cuba.

# CAPÍTULO 2

## THE USE OF ISSR MARKERS FOR SPECIES DETERMINATION AND GENETIC STUDY OF THE INVASIVE LIONFISH IN GUANAHACABIBES, CUBA

Artículo sometido a la revista *Latin American Journal of Aquatic Research* (Research article)

**The use of ISSR markers for species determination and genetic study of the invasive lionfish in Guanahacabibes, Cuba**

Elizabeth Labastida<sup>1</sup>, Dorka Cobián<sup>2</sup>, Yann Hénaut<sup>3</sup>, María del Carmen García-Rivas<sup>4</sup>,  
Pedro P. Chevalier<sup>5</sup> and Salima Machkour-M'Rabet<sup>1§</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Molecular y Conservación, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Av. Centenario km 5.5, C.P. 77014, Chetumal, Quintana Roo, México; elli\_014@hotmail.com; smachkou@ecosur.mx

<sup>2</sup> Parque Nacional Guanahacabibes, Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales (ECOVIDA), La Bajada, Municipio Sandino, Pinar del Río, Cuba; dorkacobian@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratorio de Conducta Animal, ECOSUR. Av. Centenario km. 5.5, C.P. 77014, Chetumal, Quintana Roo, México; yhenaut@ecosur.mx

<sup>4</sup>Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales – Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SEMARNAT-CONANP), Avenida Insurgentes 445, Colonia Magisterial, Chetumal, Quintana Roo, México; mcgarcia@conanp.gob.mx



<sup>5</sup>Acuario Nacional de Cuba, 3<sup>a</sup> y 62 Miramar, Playa, Ciudad Habana, Cuba;  
pedroc@acuarionacional.cu

§ Corresponding author: Salima Machkour-M'Rabet.

✉ smachkou@ecosur.mx

☎ 0052 (983) 8350440 (ext. 4782)

## ABSTRACT

The red lionfish (*Pterois volitans*) and devil fire-fish (*P. miles*) pose a threat to the biodiversity and stability of coral reefs in the Western Atlantic, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Pterois miles* has become successfully established on the USA West coast and the island of Bermuda, while *P. volitans* is more abundant, and has spread throughout the Caribbean reaching as far as Southern Venezuela. Species identification of lionfish is indeterminate in Cuba, and research has mainly been focused on the biology and ecology of the lionfish. Interest in this study was focused on determining highly polymorphic markers (ISSR) that could be used in research on lionfish population genetics as well as confirming the presence of *Pterois* species in the Guanahacabibes National Park. The genetic profile or “fingerprint” of individuals collected in Mexico, formally identified as *P.volitans*, was compared with the genetic profile of specimens from Cuba. There were very few “diagnostic bands” and a high number of common bands, which proves that the same species exists in both countries. Furthermore, Nei's genetic distance and the unrooted tree do not show significant differences between both localities. In light of these results, we can confirm the presence of *P. volitans* in the Guanahacabibes National Park of Cuba. This study demonstrates the functionality of ISSR as molecular tools for species identification and their application for genetic population studies of this invasive fish.

**Key Words:** *Pterois*, Inter Simple Sequences Repeat, Caribbean Sea, Alien species, Molecular identification, fish

## RESUMEN

El pez león rojo (*Pterois volitans*) y el pez fuego diablo (*P. miles*) son una amenaza a la biodiversidad y estabilidad de los arrecifes coralinos del Atlántico occidental, Golfo de México y Mar Caribe. *Pterois miles* se han establecido exitosamente en la costa este de E.U.A y Bermudas, mientras que *P. volitans* es más abundante y se ha extendido a través del Caribe hasta el sur de Venezuela. La identificación del pez león no se ha confirmado en Cuba y la investigación se ha centrado principalmente en la biología y ecología del pez león. Por lo tanto, nuestros intereses se enfocaron en determinar marcadores altamente polimórficos (ISSR) útiles para estudios de genética poblacional del pez león y aplicarlos para determinar la especie de *Pterois* presente en el Parque Nacional Guanahacabibes. Se comparó el perfil genético “fingerprint” de individuos colectados en México, formalmente identificados como *P. volitans*, con el perfil genético de especímenes de Cuba. Los perfiles genéticos mostraron un bajo número de “bandas diagnósticas” y un alto número de bandas comunes lo que permite determinar que es la misma especie en ambos países. Por otra parte, los resultados de distancia genética de Nei y el árbol no enraizado no muestran ninguna diferencia significativa entre ambas localidades. Considerando estos resultados, se confirmó la presencia de *P. volitans* en el Parque Nacional Guanacahabibes, Cuba y demostramos la funcionalidad de los ISSR como herramienta molecular para la identificación de especies y su aplicación para estudios de genética poblacional de este pez invasor.

**Palabras claves:** *Pterois*, Inter Secuencias Simples Repetidas, Mar Caribe, Especies invasoras, Identificación molecular, pez

## INTRODUCTION

Invasive species (alien or non-indigenous species) are a major threat to marine ecosystems. They impact ecosystem structure and function and negatively affect biodiversity (Costello et al., 2010; Ojaveer et al., 2014). In addition, invasive species can result in social conflict and economic losses (Gherardi et al., 2011). During the last decade, considerable efforts were made to understand and eradicate one of the most important invasive predators in the Atlantic, the Indo-Pacific lionfish complex: the red lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) and the devil fire-fish *P. miles* (Bennett, 1828). The invasion has progressed rapidly since the first observation of lionfish in Florida in 1985 (Morris & Akins, 2009). Today, the species has invaded an area over 7 million km<sup>2</sup> (Dahl & Paterson, 2014), including the eastern coast of the USA, Gulf of Mexico and Caribbean Sea (Schofield, 2009) as far south as Venezuela (Fortunato & Avigliano, 2014).

According to Sakai et al. (2001), the study of the genetic diversity and population structure of a new invasive species is essential as the obtained information may contribute to understanding the potential establishment and geographical dispersion of invasive species. This information could also play an important role in the development of appropriate strategies for the management of such species. Another fundamental aspect concerning invasive species is the correct identification of the introduced species and the determination of their origin. This is often problematic, mainly due to poor or outdated taxonomic information in the source regions and the area invaded, sympatric distribution with related species, cryptic taxa and multiple introductions (Stepien & Tumeo, 2006).

An erroneous taxonomic classification may obscure accurate invasion history and preclude management strategies. Because of inter and intraspecific variations, morphological identification often presents difficulties, whereas molecular markers can accurately, reliably and rapidly identify species as well as variants and cryptic taxa (Le Roux & Wiczorek, 2009). For example, Holland et al. (2004) clarified the presence of two cryptic species of jellyfishes, *Cassiopea xamachana* and *C. andromeda* (Rhizostomae, Cassiopeidae), in Hawaii. In terrestrial organisms, the use of molecular markers to resolve species boundaries in the taxonomically difficult genus *Amaranthus* (Caryophyllales, Amaranthaceae) allowed the development of diagnostic markers for rapid identification of native and exotic species within the genus (Wetzel et al., 1999). These examples show the efficacy and importance of molecular tools when carrying out research on invasive organisms, especially as taxonomic identification is a first important step towards developing effective control and management decisions (Le Roux & Wiczorek, 2009).

The choice of markers is important and depends on the specific research aims. In this context, dominant ISSR markers (Inter Simple Sequence Repeats) use the PCR-method to amplify DNA sequences between two closed but inverted SSR (Simple Sequence Repeats) by means of a single primer, generally composed of 18-20 base pairs from a microsatellite sequence (Zietkiewicz et al., 1994). The great advantage of ISSR is that the primers work universally for most animal and plant species, so prior knowledge of genome sequences is not required. This method finds abundant polymorphisms in many systems and provides genomic information for a range of applications, including population genetics, hybridization, gene

mapping and taxonomic identification among others (Maltagliati et al., 2006; Wink, 2006). ISSR markers are ideal tools to study genetic variation in contemporaneous events as their high resolution can be used for determining population structure and DNA fingerprinting (Le Roux & Wieczorek, 2009).

Dominant ISSR markers are widely used in rare plant conservation (Kothera et al., 2007), and are increasingly being used in research on animal species (Wink et al., 2002; Machkour-M'Rabet et al., 2009; Bugarski-Stanojević et al., 2011; Marouani et al., 2012, 2014). More recently, ISSR has been implemented as a robust method of species identification and to evaluate genetic diversity at lower levels (species, sub-species, populations); particularly for marine organisms (Casu et al., 2006, 2009; Maltagliati et al., 2006; Li et al., 2013).

ISSR markers are recommended for genetic studies of invasive species (Le Roux and Wieczorek, 2009). They have successfully been used to study the genetic structure of invasive weed populations (*Chromolaena odorata* L. R.M. King & H. Rob; Asterales, Asteraceae, Eupatorieae) in China (Ye et al., 2003) and determine the pattern of genetic differentiations between populations of Lessepsian invasive rabbitfish species (*Siganus rivulatus* Forsskål 1775 and *S. luridus* Rüppell 1829; Perciformes, Siganidae) in the Mediterranean (Hassan et al., 2003).

In Cuba, there is no genetic related information on the lionfish invasion (Chevalier et al., 2013). The first, albeit non-confirmed, observation of lionfish in Cuba was in 2005 (Schofield et al., 2009), and the first official report of its presence was in 2007 (Chevalier et al., 2008)

at six sites along the Atlantic coast (northern Cuba) and two localities on the Caribbean coast (Santiago de Cuba, southeastern Cuba). These authors identified both collected specimens as *P. volitans* based on morphological characters following Schultz (1986). However, both species of *Pterois* present in Florida, *P. volitans* and *P. miles*, are not 100%-distinguishable based solely on morphology (Schofield, 2009; Jud et al., 2014). Consequently, the identification of *Pterois* species in Cuba was indeterminate and required validation using molecular tools. This study case offers a good example of the use of ISSR as a genetic tool for species identification.

In this study, we propose to (1) determine the ISSR markers that may be useful for molecular genetic studies of lionfish and (2) use the ISSR technique to confirm the identification of the lionfish species in Guanahacabibes National Park, Cuba.

## **MATERIAL AND METHODS**

Cuban lionfishes were collected at Guanahacabibes National Park, the western most point of Cuba, within the Biosphere Reserve "Peninsula de Guanahacabibes". Sampling was conducted over a wide area from Cabo Corrientes to La Bajada (Fig. 1). Sampling was conducted by scuba divers between 9:00 h to 14:00 h at a water depth of 10 m to 20 m. Nineteen fishes were captured using a spear, conserved in ice and transported to the



laboratory. Muscle tissue was cut from each individual, placed in 96° ethanol, and finally conserved at 4°C for molecular analysis at ECOSUR (El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, Mexico)

Reference specimens were obtained at the “Coral Negro” within the Banco Chinchorro Biosphere Reserve in the Mexican Caribbean (Fig. 1). Twenty individuals were captured and preserved in similar conditions to the Cuban specimens. The lionfish from the Mexican Caribbean were formally identified as *Pterois volitans* using the barcoding method (Valdéz-Moreno et al., 2012).

< Fig. 1

#### ISSR Determination

Genomic DNA was extracted from a small part of the lionfish muscle tissue using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) following the manufacturer’s instructions, and stored at -20°C until amplification. DNA-concentration was determined by the Qubit®2.0 fluorometer (Invitrogen) and quality was checked using agarose gel (1% with TAE buffer 1X; Promega) and the post-gel staining method using GelRed™ (Quimica Valaner).

To identify the more reliable ISSR markers for lionfish, we probed 23 sequences (Table 1). All primers were tested using five individuals from each locality at the optimal melting temperature ( $T_m$ , plus and minus one degree) determined by a OligoAnalyser 3.1 (Intergrate DNA Technology®), which permit to define the annealing temperature ( $T_a$ ) of each primer for future amplifications.

< Table 1

PCR amplifications were performed under the following conditions: 15  $\mu$ l reaction volume containing: ~20 ng de template DNA, 1.5  $\mu$ l of 5X Green Buffer (Promega), 200  $\mu$ M of each dNTP from dNTP mix (Promega), 3 mM  $MgCl_2$  (Promega), 1  $\mu$ M of primer (Integrated DNA Technologies), 1.25 U of GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) and finally the volume was adjusted with ultrapure water. All amplifications were conducted in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad™). The cycling conditions were as follows: initial denaturation step at 94°C for 4 min, 39 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing temperature ( $T_a$ ) from 57°C to 66°C depending on the ISSR primer (Table 1), extension temperature at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min.

Amplification products were separated by electrophoresis (110 V for 2 h) using 3  $\mu$ l of amplified product on agarose gels (2% in a 1X TAE Buffer, Promega) and a 100bp DNA Ladder (Promega) was used as reference for fragment length. The bands were detected with the GelRed™ (solution at 2.5x for 20 min) under UV light and digitized using an Imaging System (AlphaImager® Mini, ProteinSimple).

### Molecular data analysis

The ISSR-PCR method presents a very high level of resolution at the individual level, allowing a comparison of common or uncommon band profiles (called diagnostic, private or signature bands) between Cuba and Mexico.

The gel separation of ISSR fragments (bands) was implemented for all individuals and the best-selected primers in order to score band presence (1) or absence (0). This information generated the binary matrix which was used for the analysis. Only bands that scored consistently were used, and we assumed that each marker band represented a distinct locus.

The following informative parameters were determined at the population level: total number of bands, number of diagnostic bands and number of polymorphic bands. The binary matrix was applied under Hardy-Weinberg equilibrium to determine the percentage of polymorphism ( $P$ ) and the Nei's gene diversity ( $h$ ) using corrected allele frequency (Lynch & Milligan, 1994) at the species and localities level. All analyses were carried out using GENALEX 6.501 (Peakall & Smouse, 2006) and POPGEN1.32 (Yeh & Boyle, 1999).

In order to describe the genetic structure and variability between localities, non-parametric Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992; 9999 permutations) and Nei genetic distance analysis were performed using GENALEX 6.501 (Peakall & Smouse, 2006). Furthermore, a Mean Distance Analysis using a heuristic search for an optimal tree, carried out by TBR (tree-bisection-reconnection) branch swapping, was conducted using PAUP 4.0b10 (Swofford, 2001) and the tree was displayed using TREEVIEW 1.5 software

(Page, 1996). The distance measurement (minimum evolution) was calculated using the mean character difference. Negative branch lengths were allowed, but set to zero for tree-score calculation. Steepest descent options were not in effect. Starting tree(s) were obtained via neighbor-joining and bootstrap values were calculated under the same criteria.

## RESULTS

We obtained functional DNA in 14 samples from Cuba and 20 from Banco Chinchorro. Out of the 23 primers tested on five individuals from each population, 17 produced clear reproducible fragments (Table 1). For this study, we selected five primers (Fig. 2) which presented a high percentage of G/C bases and a high number of bands.

Finally, we obtained 113 bands of ISSR fragments ( $(GACA)_4WB$ : 18 bands;  $(CA)_8AC$ : 17 bands;  $(CA)_8AG$ : 23 bands;  $(AG)_8YC$ : 24 band and  $(GAG)_5GC$ : 31 bands) using 34 individuals from both localities. Table 2 shows the numbers of bands scored, the polymorphic bands present at each locality and the number of diagnostic bands (bands founded in only one population). (Luque et al., 2002). Polymorphism is high (83.5%), with Cuba samples presenting the lowest value, and Global Nei's gene diversity is 0.26 ( $\pm 0.017$  SD) with Mexican samples presenting the lowest value.

< Fig. 2

< Table 2

AMOVA revealed that the majority of variability occurred among individuals within populations (98%,  $P = 0.08$ ) and, Nei genetic distance value is very low between both localities (0.035). Distance analysis did not demonstrate any significant differences or grouping between our two populations. No clusters were discernible and there were no bootstrap values above 50% (Fig. 3).

< Fig. 3

## DISCUSSION

This first preliminary study identified a high number of ISSR loci for the analysis of genetic variability and population structure of the lionfish in the Caribbean. The high level of ISSR resolution for the study of contemporary events makes these markers excellent candidates for genetic studies of biological invasions. Furthermore, ISSR is straightforward, demands fewer experimental steps, and incurred costs are relatively low (Huang & Sun, 2000; Le Roux & Wiczorek, 2009).

Others dominant markers have been proved valuables for species identification. Lakra et al. (2007) developed a PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method to detect interspecific genetic variability and genetic relatedness among five Indian sciaenid species. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) generates hundreds of informative genetic loci that increase the probability of detection of species-specific polymorphism (Teletchea, 2009). Maldini et al. (2006) assessed the potential use of AFLP for the taxonomic characterization of fish and seafood species in commercial products.

In this study, the number of bands amplified by five primers were 113 (102 polymorphic) and can be considered adequate to species determination and populations genetics studies. Actually, other studies of molecular identification and genetic populations in fish species detected a similar number of bands. For example, Casu et al. (2009) detected 97 fragments when considering eight primers in *Dentex dentex* L. 1758 (Perciformes, Sparidae). A study on *Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873 (Pleuronectiformes, Cynoglossidae) reported 137 fragments using 19 ISSR primers (Liu et al., 2009). Maltagliati et al. (2006) recorded 101 bands amplified by nine ISSR primers in cyprinodontiform fish. The high ISSR polymorphism reported in this study provide a high number of fragments for subsequent estimates of population genetic parameters.

This study provides definite confirmation that the species present in Cuba is *Pterois volitans*. ISSR markers have already been used to discriminate other fish species, such as cyprinodontiform (Maltagliati et al. 2006) and *Diplodus* spp. Casu et al. (2009). "Diagnostic bands" (Luque et al. 2002) are characteristic of each species. Maltagliati et al. (2005) refined this concept and defined two kinds of "diagnostic bands". Bands present in all individuals of one species but not in other taxa are called "fully diagnostic bands" while bands present only in one species, but not in all individuals, are called "nearly- diagnostic bands". The identification of species using the ISSR method always reveals a high number of fully and nearly diagnostic bands (Maltagliati et al., 2006; Casu et al., 2009). This study did not find many diagnostic bands but we observed a high number of common bands between both

localities, which confirms that all the individuals belong to the same species: *P. volitans*. This is further confirmed by the lack of structure in the unrooted tree.

This work is an initial analysis of genetic aspects of the lionfish invasion in Cuba. By using ISSR, we corroborated that *P. volitans*, is the only species of *Pterois* present in the Guanahacabibes National Park. In addition, we present evidence that ISSR markers might be useful for systematic investigation at the species and subspecies level. Finally, we propose that this technique is an excellent alternative for low-cost genetic monitoring focused on improving control programs of this invasive species in regions that have a lack of financial resources, such as Latin America.

Given that Guanahacabibes was one of the last places in Cuba to be colonized by lionfish (late 2009) (Chevalier et al., 2013). We recommend extending this research to the rest of the Cuban archipelago. Considering that the first sightings of *P. volitans* were reported on the north coast of Cuba, the genetic analysis of populations both in the north of the archipelago, and along the entire Cuban coast is recommended, in order to obtain a complete genetic characterization of this invasive fish in Cuba.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACyT) for the financial support provided through the scholarship No. 288387. Also thank the “Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas” (CONANP) and the “Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca” (CONAPESCA) who made this research possible by granting permission for collecting specimens in Mexico. We thank the fishermen of “Banco Chinchorro”, who helped during the capture of specimens. We are grateful to the “Acuario Nacional de Cuba” and “Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba” for permission to collect and export samples in Cuba. Thanks to Dr. Juan Jacobo Schmitter Soto (ECOSUR) for his valuable comments and suggestions on this manuscript and to M. Sc. Arely Martínez Arce (ECOSUR) for her support during the laboratory work. Finally, we would like to thank Oc. Fernando Tlaloc Valdez Miranda who helped create the maps.



## REFERENCES

- Bugarski-Stanojević, V., J. Blagojević, G. Stamenković, T. Adnađević, E. Giagia-Athanasopoulou & M. Vujošević. 2011. Comparative study of the phylogenetic structure in six *Apodemus* species (Mammalia, Rodentia) inferred from ISSR-PCR data. *Syst. Biodivers.*, 9(1): 95-106
- Casu, M., D. Casu, T. Lai, P. Cossu & M. Curini-Galletti. 2006. Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. *Mar. Biol.*, 149(5): 1163-1174
- Casu, M., T. Lai, M. Curini-Galletti, A. Ruiu & A. Pais. 2009. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *J. Exp. Marine Biol.*, 368(2): 147-152
- Chevalier, P., E. Gutiérrez, D. Ibarzabal, S. Romero, V. Isla, J. Calderín, & E. Hernández. 2008. Primer registro de *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) para aguas cubanas. *Solenodon*, 7: 37-40
- Chevalier, P. P. y colectivo de autores. 2013. Informe final de proyecto “Estudio preliminar de la presencia del pez león (Teleostei: Scorpaenidae: *Pterois* spp.) en aguas cubanas. Acuario Nacional de Cuba. Código: DB052. 70 pp

- Huang, J. & M. Sun. 2000. Fluorescent PAGE analysis of microsatellite-primed PCR: a fast and efficient approach for genomic fingerprinting. *Biotechniques*, 2(8): 1068-1072
- Costello, J., M. Coll, R. Danovaro, P. Halpin, H. Ojaveer & P. Miloslavich. 2010. A census of marine biodiversity knowledge, resources, and future challenges. *PLOS One*, 5(8), e12110
- Dahl, K. & Patterson, W. 2014. Habitat-specific density and diet of rapidly expanding invasive red lionfish, *Pterois volitans*, populations in the northern Gulf of Mexico. *PLOS One*, 9(8): e105852. doi:10.1371/journal.pone.0105852
- Excoffier, L., P. Smouse & J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479–491
- Fortunato, R. & E. Avigliano. 2014. Presence of genus *Pterois* (Oken, 1817) (Scorpaeniformes, Scorpaenidae): extension of invasive range in Caribbean Sea and first published record for Los Frailes Archipelago. *J. Fish. Sci.*, 8(2): 88-91
- Gherardi, F., L. Aquiloni, J. Diéguez-Uribeondo & E. Tricarico. 2011. Managing invasive crayfish: is there a hope? *Aquat. Sci.*, 73(2): 185-200
- Hassan, M., M. Harmelin-Vivien & F. Bonhomme. 2003. Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 291(2): 19– 232

- Holland, B., M. Dawson, G. Crow & D. Hofmann. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Mar. Biol.*, 145: 1119–1128
- Jud, Z. R., P. Nichols & A. Layman. 2014. Broad salinity tolerance in the invasive lionfish *Pterois* spp. may facilitate estuarine colonization. *Environ. Biol. Fish.*, DOI 10.1007/s10641-014-0242-y
- Kothera, L., C. Richards & S. Carney. 2007. Genetic diversity and structure in the rare Colorado endemic plant *Physariabellii* Mulligan (Brassicaceae). *Conserv. Genet.*, 8: 1043-1050
- Lakra W., M. Goswami, V. Mohindra, K. P. Lal & P. Punia. 2007. Molecular identification of five Indian scianids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) using RAPD markers. *Hydrobiologia*, 583: 359–363
- Li, W., W. Sun, J. Fan & C. Zhang. 2013. Genetic diversity of wild and cultured swamp eel (*Monopterus albus*) populations from central China revealed by ISSR markers. *Biologia*, 68(4): 727-732
- Le Roux, J, & A. Wicczorek. 2009. Molecular systematics and population genetics of biological invasions: towards a better understanding of invasive species management. *Ann. Appl. Biol.*, 154: 1–17

- Luque, C., L. Legal, H. Staudter, C. Gers & M. Wink. 2002. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, 136: 251–253
- Liu, G., Yu, Z., Bao, L., Bao, B., Sun, X., Shi, Q. y X. Liu. Population genetics studies of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* using ISSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.*, 36: 821-827
- Lynch, M. & B. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 3: 91-99
- Machkour-M'Rabet, S., Hénaut, Y., Charruau, P., Gevrey, M., Legal L. 2009. Extinction risk of the American crocodile in the Mexican Caribbean revealed by ISSR-PCR method: Implication for Conservation. *Mar. Biol.*, 156: 1321-1333
- Machkour-M'Rabet, S., Y., Hénaut, S., Calmé y L. Legal. 2012. When landscape modification is advantageous for protected species. The case of a synanthropic tarantula, *Brachypelma vagans*. *J. Insect. Conserv.*, 16(4): 479-488
- Machkour-M'Rabet, S., R., Leberger, J., L., León-Cortés, C., Gers & L., Legal. 2014. Population structure and genetic diversity of the only extant Baroninae swallowtail butterfly, *Baronia brevicornis*, revealed by ISSR markers. *J. Insect. Conserv.*, 18(3): 385-396
- Maldini M, F. Marzano & G. Fortes. 2006. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: elaboration of a species database. *Aquaculture* 261: 487–494

- Maltagliati, F., M. Casu, T. Lai, D. Sareri, D. Casu, M. Galletti, Catone, G. & A. Castelli. 2005. Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida: Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 85(04): 835-841
- Maltagliati, F., T. Lai, M. Casu, S. Valdesalici & A. Castelli. 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochem. Syst. Ecol.*, 34(8): 626-634
- Marouani, S., R. Chaâba, H. Kadri, B. Saidi, A. Bouain, F. Maltagliati, P. Last, B. Séret & M. Bradai. 2012. Taxonomic research on *Squalus megalops* (Macleay, 1881) and *Squalus blainvillei* (Risso, 1827) (Chondrichthyes: Squalidae) in Tunisian waters (central Mediterranean Sea). *Sci. Mar.*, 76(1): 97-102
- Morris, J. & J. Akins. 2009. Feeding ecology of invasive lionfish (*Pterois volitans*) in the Bahamian archipelago. *Environ. Biol. Fish.*, 86(3): 389-398
- Ojaveer, H., B. Galil, D. Minchin, S. Olenin, A. Amorim, J. Canning-Clode & A. Zeneto. 2014. Ten recommendations for advancing the assessment and management of non-indigenous species in marine ecosystems. *Mar. Policy*, 44: 160-16
- Page, R. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*, 12: 357-358

- Peakall, R. & P. Smouse. 2006. GENALEX V6.501: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 288-295
- Sakai, A., F. Allendorf, J. Holt, D. Lodge, J. Molofsky, K. With, S. Baughman, R. Cabin, J. Cohen, N. Ellstrand, D. McCauley, P. O'Neil, I. Parker, J. Thompson & S. Weller. 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32: 305-32
- Schofield, P. 2009. Geographic extend 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. *Aquat. Invasions*, 4(3): 473-479
- Schofield, P., J. Morris & L. Akins. 2009. Field guide to nonindigenous marine fishes of Florida. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, National Centers for Coastal Ocean Science.
- Schultz, E. T. 1986. *Pterois volitans* and *Pterois miles*: two valid species. *Copeia*, 1986(3): 686-690
- Stepien, C. & M. Tumeo. 2006. Invasion genetics of Ponto-Caspian gobies in the Great Lakes: a 'cryptic' species, absence of founder effects, and comparative risk analysis. *Biol. Invasions*, 8: 61-78
- Swofford, D. 2001. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer, Sunderland (Version 4.0b10).

- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 19: 265-293
- Valdéz-Moreno, M., C. Quintal-Lizama, R. Gómez-Lozano & M. García-Rivas. 2012. Monitoring an alien invasion: DNA barcoding and the identification of lionfish and their prey on coral reefs of the Mexican Caribbean. *PLOS One*, 7(6): e36636
- Wetzel, D., M. Horak & D. Skinner. 1999. The use of PCR-based molecular markers to identify weedy *Amaranthus* species. *Weed Sci.*, 47: 518–523
- Wink, M. 2006. Use of DNA markers to study bird's migration. *J. Ornithol.*, 147: 234-244
- Wink, M., H. Sauer-Gurth & E. Gwinner. 2002. A molecular phylogeny of stonechats and related turdids inferred from mitochondrial DNA sequences and genomic fingerprinting by ISSR-PCR. *Brit. Birds*, 95: 349–355
- Yeh, F. and T. Boyle. 1999. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg. J. Bot.*, 129: 157
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2): 176–183

**TABLES AND FIGURES**

Abbreviation	% GC	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	Amplification pattern	Total bands	Size range (pb)
(CA) <sub>7</sub>	50	55.2	54	Poor amplification	-	-
(CT) <sub>8</sub> C	52.9	55.7	54	Poor amplification	-	-
(GAA) <sub>6</sub>	33.3	53.9	52	Smearred with bands	4	900-300
(CA) <sub>8</sub> GT	50	62.5	61	Smearred with bands	5	1100-300
(AC) <sub>8</sub> C	52.9	62.3	61	Smearred with bands	6	800-600
(GA) <sub>8</sub> G	52.9	55.7	54	Good	4	800-450
(AC) <sub>8</sub> G	52.9	62.5	61	Good	5	1100-400
(GT) <sub>8</sub> C	52.9	60.4	59	Good	5	1500-900
(GA) <sub>8</sub> C	52.9	56	54	Good	7	900-200
<b>(CA)<sub>8</sub>AC</b>	<b>50</b>	<b>61.4</b>	<b>60</b>	<b>Good</b>	<b>8</b>	<b>1500-200</b>
(GACA) <sub>4</sub>	50	57.1	56	Good	8	1500-200
(AG) <sub>8</sub> Y	50	57.6	56	Good	8	1200-200
(AG) <sub>8</sub> C	52.9	58.2	57	Good	8	1200-200
(GTG) <sub>5</sub> GC	70.6	67.8	66	Good	9	1500-400



<b>(CA)<sub>8</sub>AG</b>	<b>50</b>	<b>61.1</b>	<b>60</b>	<b>Good</b>	<b>9</b>	<b>1600-200</b>
WB(GACA) <sub>4</sub>	48.1	61.5	60	Good	10	1500-200
BDB(ACA) <sub>5</sub>	37	58.4	57	Good	11	1700-100
<b>(AG)<sub>8</sub>YC</b>	<b>52.8</b>	<b>59.5</b>	<b>58</b>	<b>Good</b>	<b>11</b>	<b>1600-200</b>
<b>(GAG)<sub>5</sub>GC</b>	<b>70.6</b>	<b>64.8</b>	<b>63</b>	<b>Good</b>	<b>12</b>	<b>1400-400</b>
(AG) <sub>8</sub> G	52.9	57.5	56	Good	13	1600-200
(ACA) <sub>5</sub> BDB	37	58.6	57	Good	13	1700-200
<b>(GACA)<sub>4</sub>WB</b>	<b>48.1</b>	<b>59</b>	<b>57</b>	<b>Good</b>	<b>14</b>	<b>1500-200</b>
(CA) <sub>8</sub> RY	50	62.1	61	Smearred	-	-

Table 1. -ISSR primers screened for ISSR-PCR in lionfish. %GC (proportion of G and C bases in the sequence),  $T_m$  (melting temperature),  $T_a$  (annealing temperature), B = T, C or G; D = A, G or T; R = A or G; Y = C or T and W = A or T. Number of total bands is of 5 individuals from each locality. Primers written in bold were used for the analysis.

Tabla 1. Iniciadores ISSR seleccionados para ISSR-PCR en pez león. % GC (proporción de bases de G y C en la secuencia);  $T_m$  (temperatura de fusión);  $T_a$ : (Temperatura de alineamiento), B = T, C o G; D = A, G o T; R = A or G; Y = C o T and W = A o T. Número total de bandas considerando 5 individuos de cada localidad. Los iniciadores en negritas fueron usados para el análisis

Locality	n	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>	P (%)	<i>h</i> (± SD)
Mexico	14	107	82	4	75.2	0.246 (0.018)
Cuba	20	105	79	2	72.5	0.253 (0.019)

Table 2. Genetic diversity of lionfish at Cuban and Mexican localities based on ISSR markers. *n*: number of individuals kept for analysis; N<sup>1</sup>: number of bands scored; N<sup>2</sup>: number of polymorphic bands; N<sup>3</sup>: number of diagnostic bands; *P*: percentage of polymorphism; *h*: Nei's gene diversity; SD: standard deviation.

Tabla 2. Diversidad genética del pez león en Cuba y México basada en marcadores ISSR. *n*: número de individuos considerados en el análisis; N<sup>1</sup>: número de bandas; N<sup>2</sup>: número de bandas polimórficas; N<sup>3</sup>: número de bandas diagnósticas ; *P*: porcentaje de polimorfismo; *h*: diversidad genética de Nei; SD: desviación estándar.

Fig. 1

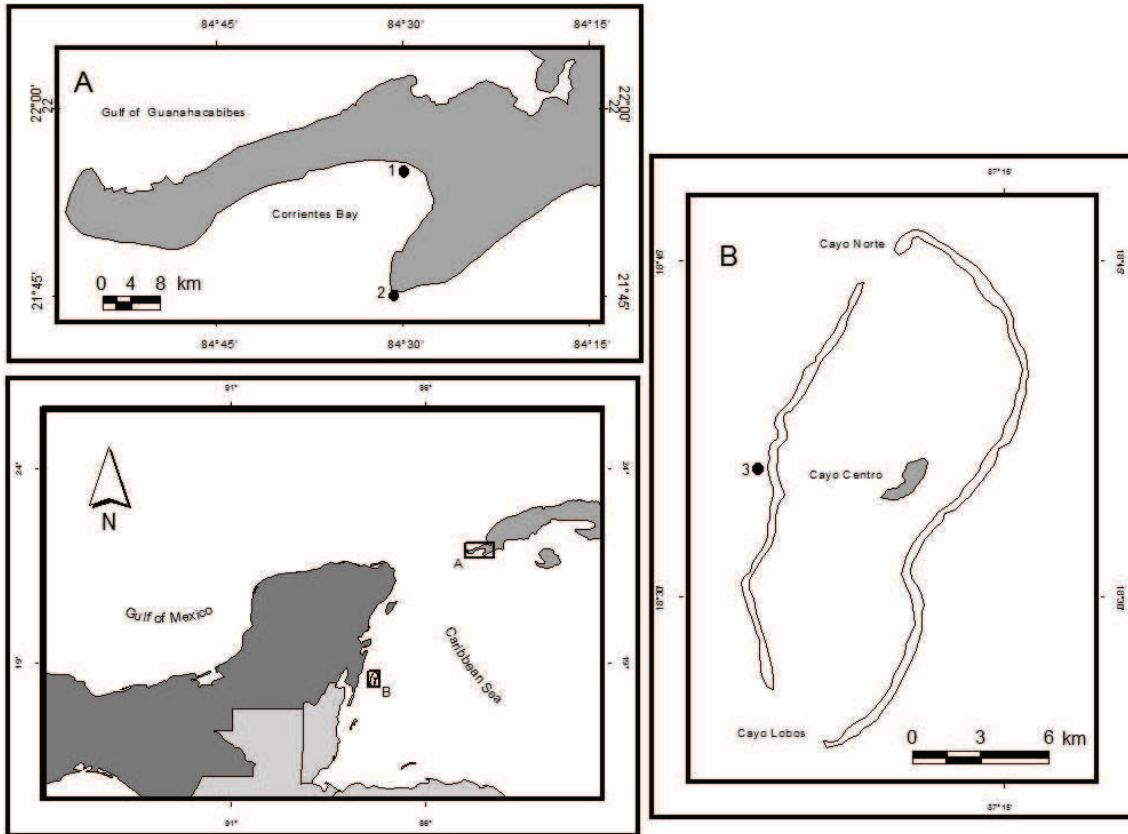


Figure 1. Location of the lionfish samples in the Caribbean Sea. Black dots indicate sampling locations. A: localities in Cuba: La Bajada (1) and Cabo Corrientes (2) and, B: locality in Mexico: Banco Chinchorro (3)

Figura 1. Localización de las muestras de pez león en el Caribe Mexicano, Los puntos negros indican las localidades muestreadas. A. localidades en Cuba. La Bajada (1) y Cabo Corrientes (2) y, B. localidades en México. Banco Chinchorro (3)

Fig. 2

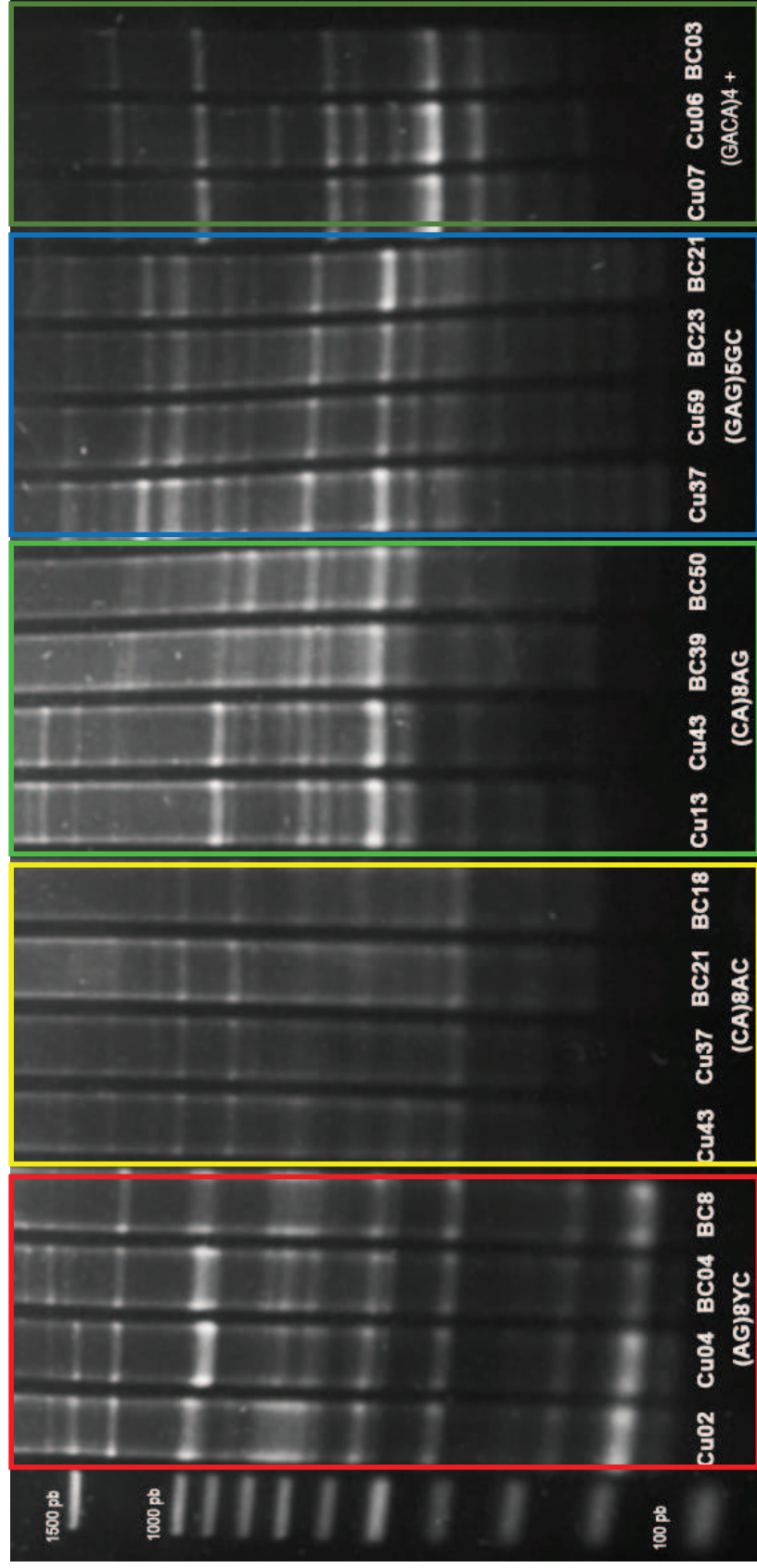


Figure 2. Example of polymorphic banding patterns of the five selected markers [(AG)<sub>8</sub>YC, (CA)<sub>8</sub>AC, (CA)<sub>8</sub>AG, (GAG)<sub>5</sub>GC, (GACA)<sub>4</sub>WB] for both localities. First line corresponds to the DNA ladder (from 100 bp to 1000 bp by steps of 100 bp and one band at 1500 bp), Cu: individuals from Cuba, BC: individuals from Mexico

Figura 2. Ejemplo de los patrones de bandas polimórficas obtenidas por los cinco marcadores seleccionados [(AG)<sub>8</sub>YC, (CA)<sub>8</sub>AC, (CA)<sub>8</sub>AG, (GAG)<sub>5</sub>GC, (GACA)<sub>4</sub>WB] para ambas localidades. La primera línea corresponde a la escalera de DNA de peso molecular conocido (de 100 pb a 1000 pb en secciones de 100 pb y una banda de 1500 pb). Cu: individuos de Cuba, BC: individuos de México

Fig. 3

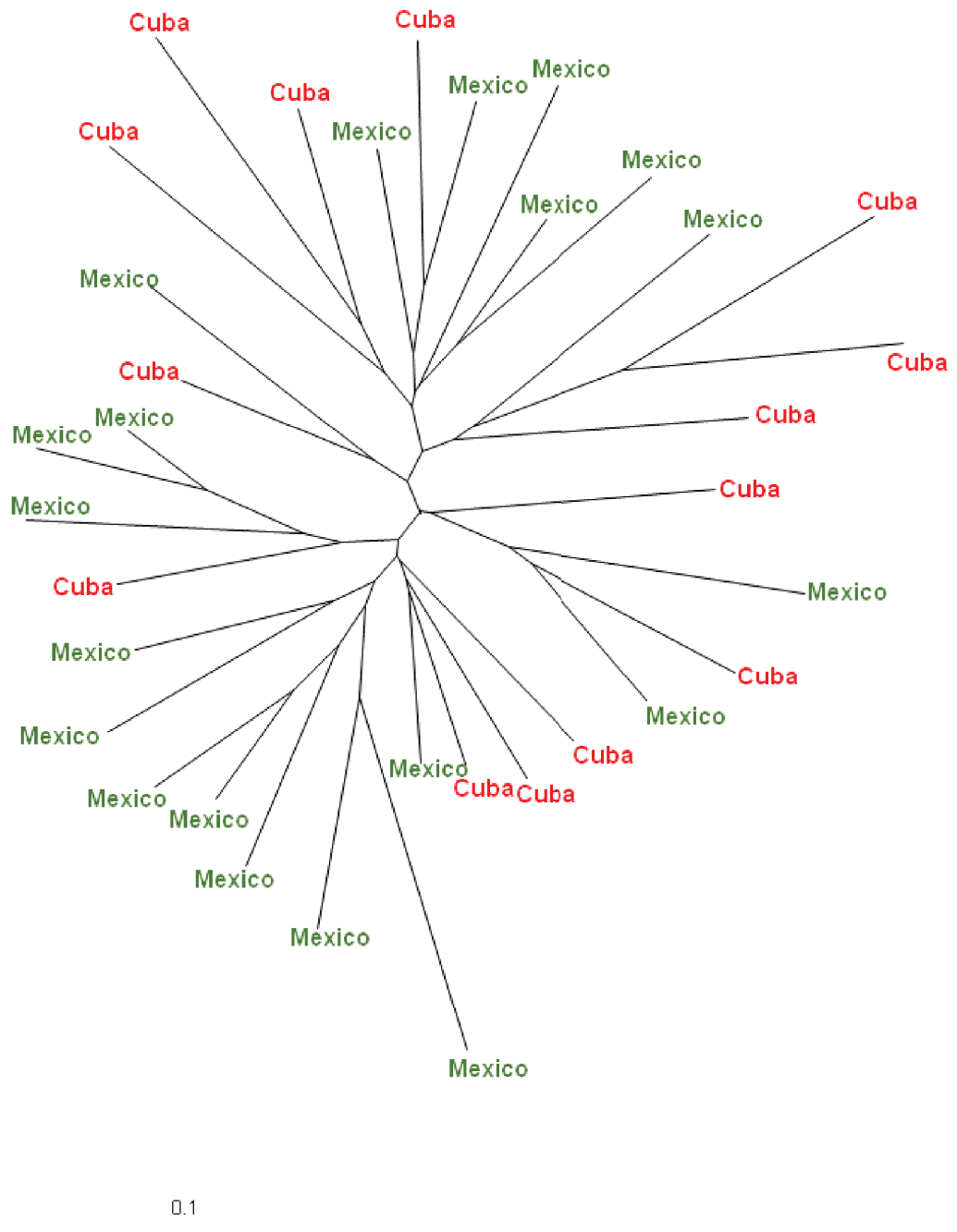


Figure 3. Unrooted tree obtained by distance analysis for lionfish samples from localities in Cuba and Mexico

Figura 3. Árbol no enraizado obtenido mediante un análisis de distancia para muestras de pez león de localidades en México y Cuba.

# **CAPÍTULO 3**

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL  
DEL PEZ LEÓN (*Pterois volitans*) EN EL CARIBE  
NOROCCIDENTAL, MEDIANTE INTER SECUENCIAS  
SIMPLES REPETIDAS (ISSR)**



## RESUMEN

La invasión del pez león, aunada a las presiones que enfrentan los arrecifes coralinos en la región del Caribe, es una preocupación para la conservación de estos ecosistemas. La genética de poblaciones permite establecer los procesos genéticos implicados en el éxito de este potente invasor. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad genética y estructura poblacional en seis localidades en el Caribe noroccidental (Banco Chinchorro, Puerto Morelos e Xcalak en México, Turneffe en Belice, Guanahacabibes en Cuba, y La Parguera en Puerto Rico) usando Inter Secuencias Simples Repetidas.

Nuestros resultados sugieren la existencia de una sola población a lo largo del Caribe noroccidental, la cual se caracteriza por bajos niveles de diversidad genética consecuencia de un efecto fundador. Se observó también un déficit de heterocigos en todas las localidades, explicable por endogamia o por efecto Wahlund.

Por otro lado, se encontró una ligera pero significativa estructuración geográfica, la cual se explica por el mecanismo de dispersión larval de *P. volitans* y por los patrones de las corrientes en la región. La corriente del Caribe permite la conectividad biológica entre Puerto Rico y Puerto Morelos, mientras que la corriente de Yucatán explica la dispersión de larvas provenientes de Banco Chinchorro e Xcalak hasta Cuba, así como como el retorno de las larvas al Caribe mexicano. La

fractura de la conectividad genética entre Belice y el norte del Arrecife Mesoamericano, permite explicar la diferenciación de los organismos de Belice.

**PALABRAS CLAVE:** Genética de poblaciones, variabilidad genética, invasión biológica, ISSR,

## INTRODUCCIÓN

Las especies invasoras son una de las principales amenazas que contribuyen al deterioro de los ecosistemas y a la pérdida de especies nativas (Aguirre-Muñoz et al., 2009). El impacto ecológico y económico de las invasiones biológicas ha generado interés en la investigación científica con el objetivo de contrarrestar el problema (Le Roux y Wieczorek, 2009). La investigación genética permite explicar los patrones y procesos que favorecen el éxito de las especies invasoras (Lawson y Estoup, 2011); sin embargo, son pocos los casos de invasiones biológicas en los cuales se han abordado los aspectos genéticos (Rius et al., 2014).

La genética de poblaciones se enfoca en describir la cantidad y estructura de la variación genética dentro y entre poblaciones para entender los procesos evolutivos involucrados (Hufbauer, 2004). Se centra en explicar la variación genética en las poblaciones causada por procesos como la selección natural y la deriva génica, los cuales reducen la diversidad genética o bien por procesos como la migración y mutación, que la incrementan (Eguiarte et al., 2007).

Las especies invasoras poseen características genéticas que pueden ser clave para dispersarse y establecerse fuera de su rango nativo. La diversidad genética puede contribuir al éxito de la invasión al proporcionar material genético indispensable para la adaptación en respuesta al nuevo hábitat (Badyaev y Martin, 2000; Pappert et al., 2000; Tsutsui et al., 2000). En especies invasoras ésta

diversidad puede provenir de la introducción de pocos individuos altamente polimórficos o por introducciones múltiples (Riquet et al., 2013).

Sin embargo, en las primeras etapas de la invasión, la diversidad genética es reducida con respecto a las poblaciones en su rango nativo (Sakai et al., 2001). Al respecto Frankham (2005) propone un dilema genético que plantea ¿Cómo poblaciones que han sufrido un cuello de botella o efecto fundador, por lo tanto presentan baja diversidad genética, un bajo potencial evolutivo y potencialmente una baja adecuación son poblaciones invasoras altamente exitosas? Algunas soluciones a este dilema incluyen especies con altas tasas reproductivas, especies con la capacidad de purgar alelos deletéreos y especies con altas tasas de migración (Frankham, 2005).

Al respecto, algunos estudios han demostrado que bajos niveles de diversidad genética no comprometen el establecimiento y dispersión de las especies invasoras (Dupont et al., 2007; Roman y Darling, 2007; Rius y Shenkar, 2012). Un ejemplo es el trabajo de Golani et al. (2007) en el cual documentaron que, a pesar de la pérdida de la diversidad genética en poblaciones del pez invasor *Fistularia commersonii*, esta especie ha experimentado un éxito sin precedentes y una rápida propagación a través del mar Mediterráneo.

Allendorf y Lundquist (2003) consideraron que procesos genéticos como el flujo génico, el cuello de botella, el efecto fundador y la deriva génica pueden influir en el éxito de las especies exóticas. En este sentido, Kristensen y Sorensen (2005)

sugieren que no todos los efectos genéticos causados por una drástica reducción poblacional son negativos, por ejemplo posterior a un efecto fundador, los alelos deletéreos pueden ser purgados por selección en poblaciones endogámicas lo que aumenta su adecuación y por lo tanto la posibilidad de establecerse con éxito fuera de su rango nativo.

El pez león (*Pterois volitans* Linnaeus, 1758; Scorpaeniformes, Scorpaenidae) es originario en los océanos Índico y Pacífico (Schultz, 1986). El establecimiento de esta especie fuera de su hábitat original comenzó en 1985 cuando se registró su presencia en la costa suroriental de Florida (Morris y Akins, 2009). Posteriormente, se reportó el avistamiento de algunos ejemplares en Biscayne Bay (costa atlántica del sur de Florida) tras el paso del huracán Andrew en 1992 (Courtenay, 1995). Whitfield et al. (2002) reportaron especímenes en la costa de Florida, Carolina del Norte y Bermudas. Schofield (2009) documentó que entre 2004 y 2006 la invasión se había extendido hasta Bahamas y se dirigía hacia otras zonas del Caribe. A partir del primer avistamiento en mayo de 2009, los registros de *P. volitans* en la zona sur del mar Caribe (Costa Rica hasta Venezuela) fueron cada vez más frecuentes (Schofield, 2010). En la región noroccidental del Caribe existen reportes de avistamientos en Cuba, Belice, Puerto Rico y México entre otros países (Chevalier et al., 2008; Schofield, 2009; Aguilar-Perera y Tuz-Sulub, 2010).

Los efectos biológicos y ecológicos posteriores a la invasión del pez león son diversos; por ejemplo, modifica las redes alimenticias, lo cual repercute en los diferentes niveles tróficos (Arias-González et al., 2011). Al competir por los recursos (en particular alimento y hábitat), el pez león desplaza a otras especies de importancia ecológica o económica, tales como los pargos y los meros en la región del Golfo de México y del Caribe (Morris, 2013). El aumento en la densidad poblacional de *P. volitans* modifica la biodiversidad y estructura de las comunidades de peces arrecifales (Albins y Hixon, 2008). Además, los efectos de la interacción entre la invasión del pez león y los factores de estrés preexistentes en los arrecifes coralinos (como el blanqueamiento, cambio climático, acidificación del océano, sobrepesca, contaminación) podrían acelerar el deterioro de estos ecosistemas de manera profunda e imprevisible (Morris, 2013).

La invasión del pez león ofrece un excelente modelo para investigar los procesos genéticos que ocurren durante la invasión (Betancur-R. et al., 2011). Algunos estudios realizados empleando citocromo b sugieren que la población de *P. volitans* en la costa este de E.U.A se caracteriza por una baja diversidad genética debido a un fuerte efecto fundador (Hamner et al., 2007). Freshwater et al. (2009) presentaron un estudio usando la región control del DNA mitocondrial para determinar que no hay diferenciación significativa entre las poblaciones de Bahamas y Carolina del Norte. Este resultado, aunado a la información disponible sobre el patrón de las corrientes oceánicas, sugiere que la población de pez león de Bahamas se originó en la costa este de Estados Unidos.

Betancur-R. et al. (2011) utilizaron la región control del DNA mitocondrial para determinar la extensión de la invasión y cuantificaron la variabilidad genética en seis poblaciones invasoras: tres en el Atlántico occidental (costa este de E.U.A., Bahamas, Bermudas), y tres en el Caribe (Gran Caimán, Nicaragua y Colombia). Encontraron que la diversidad genética de las poblaciones invasoras de *P. volitans* fue más baja que la de las poblaciones nativas de *Pterois*. Este trabajo confirma que la introducción produjo un efecto fundador y que, a pesar de la relativa homogeneidad genética de las seis poblaciones del Atlántico occidental, hay una diferenciación importante entre éstas y las del Caribe. En Puerto Rico, Toledo et al. (2014) analizaron la diversidad genética en poblaciones alrededor de la isla y reportaron una diferenciación significativa entre las poblaciones de la costa este y sur, lo cual sugiere que la invasión probablemente comenzó con la dispersión de adultos o larvas desde la costa de Florida.

Una cuestión por abordar sobre la invasión del pez león en el Caribe noroccidental (México, Belice, Cuba y Puerto Rico) es determinar si los individuos son genéticamente homogéneos o si presentan estructura geográfica como consecuencia de la conectividad biológica generada por la dinámica de las corrientes que confluyen en el Mar Caribe (Roberts, 1997). Considerando lo anterior, proponemos realizar una caracterización genética de *P. volitans* en el Caribe noroccidental. Esta investigación plantea los siguientes objetivos: 1) Evaluar la diversidad genética de la especie en la región y en cada localidad y 2) Determinar si existe diferenciación genética entre las localidades

Proponemos el uso, por primera vez en *Pterois*, de los ISSR como marcador molecular. Estos marcadores consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (GT)<sub>n</sub> o (CA)<sub>n</sub> ubicados entre secuencias no repetidas del genoma nuclear. Esta técnica presenta ventajas tales como la detección de un gran número de bandas polimórficas, lo que permite obtener información más fina de la variación individual de los organismos, y por lo tanto son recomendados en estudios a nivel poblacional (Behura, 2006; Wink, 2006). Además, estos marcadores son fáciles de montar, presentan alta repetitividad y son universales lo que reduce los costos sustancialmente (González y Aguirre, 2007).

Los ISSR se han usado exitosamente en de genética poblacional en diversas especies de peces, tales como *Valencia hispanica* (Maltagliati et al., 2006), *Trachidermus fasciatus* (Bi et al., 2011), y *Sardinella zunasi* (Ying et al., 2011). Estos marcadores genéticos también se han aplicado en la caracterización genética de dos especies de sigánidos invasores, *Siganus rivulatus* y *S. luridus* (Hassan et al., 2003), y en otros grupos, se han empleado para analizar la diversidad genética entre poblaciones de una plaga de maíz, *Athelis lepigone* (Chen et al., 2014).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Se obtuvieron 251 muestras de tejido muscular de pez león (*Pterois* spp.) durante 2013 y 2014 en cuatro países del Caribe noroccidental (Fig. 1, Cuadro 1) de las siguientes localidades:

1) **México**. Tres áreas naturales protegidas (ANP) en el estado de Quintana Roo: a) Reserva de la Biósfera Banco Chinchorro (RBBCH), a 30.8 km del poblado de Mahahual, (CONANP, 2000a), b) Parque Nacional Arrecifes de Xcalak (PNAX), en la costa sur del estado de Quintana Roo (CONANP, 2004) y c) Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos (PNAPM), frente al poblado del mismo nombre (CONANP, 2000b).

2) **Belice**. Reserva Marina Atolón de Turneffe (RMAT), a 40.2 km al este de la Ciudad de Belice, es el atolón más grande y con mayor diversidad biológica del país (Wildtracks, 2011).

3) **Cuba**. Parque Nacional Guanahacabibes (PNG), zona núcleo de la Reserva de la Biosfera Península de Guanahacabibes, occidente de la provincia Pinar del Río (Aránega et al., 2009).

4) **Puerto Rico**: Frente a la costa este de la isla, alrededor de la zona La Parguera, municipio de Lajas, sureste de la isla (Vélez-Zuazo, com. pers.)

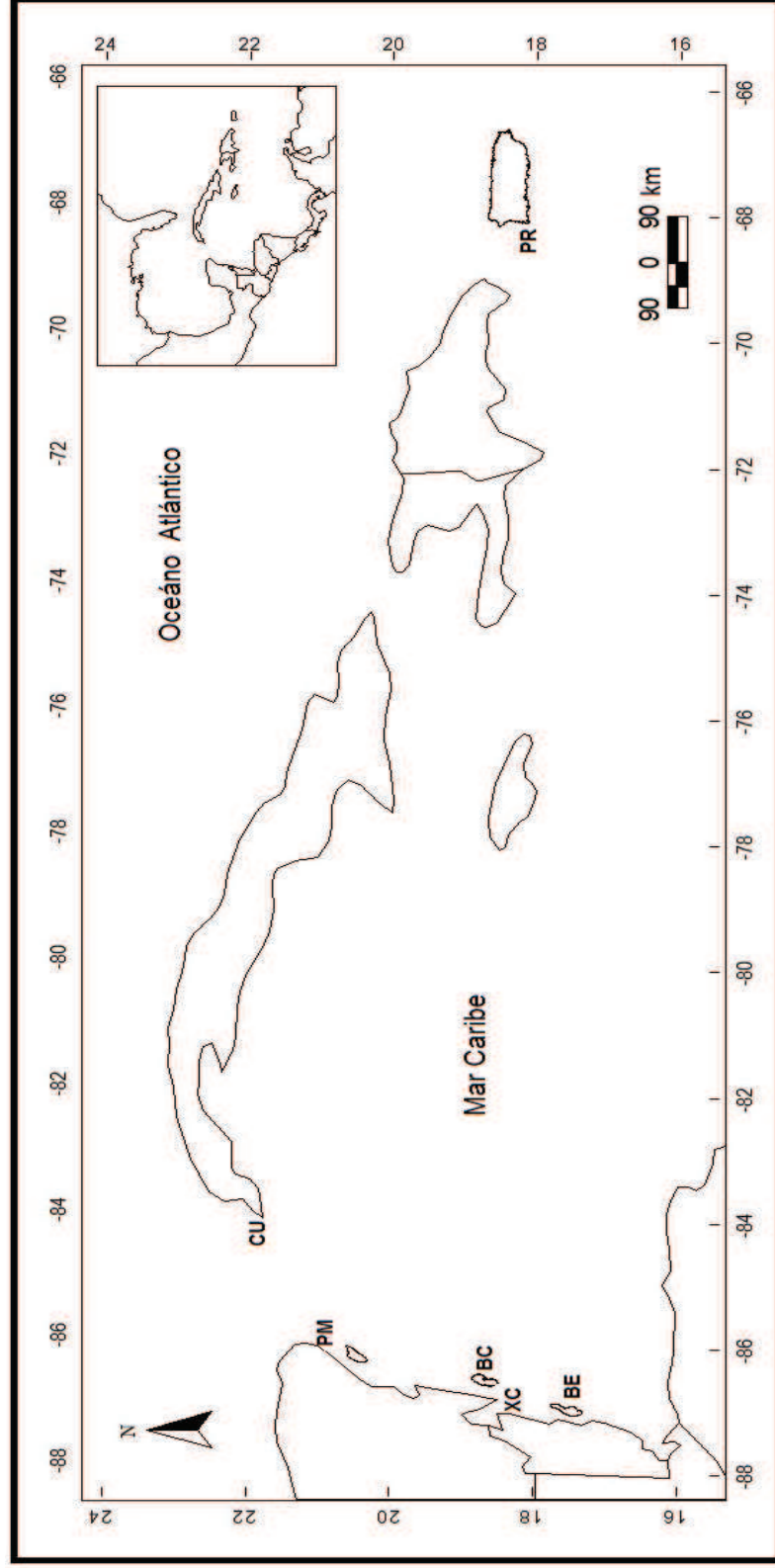


Fig. 1. Sitios de captura de *P. volitans* en el Caribe noroccidental. Belice (BE), Xcalak (XC), Banco Chinchorro (BC), Puerto Morelos (PM), Cuba (CU) y Puerto Rico (PR)

Cuadro 1. Sitios de captura de *P. volitans* en el Caribe noroccidental. *N*: número de muestras obtenidas

País	Localidad	Abreviatura	<i>N</i>	Institución/ Colector
México	Reserva de la Biosfera Banco Chinchorro	BC	55	CONANP-ECOSUR Personal técnico-Elizabeth Labastida
	Parque Nacional Arrecifes de Xcalak	XC	41	CONANP-ECOSUR Personal técnico-Elizabeth Labastida
	Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos	PM	43	CONANP-ECOSUR Personal técnico-Elizabeth Labastida
Belice	Reserva Marina Atolón de Turneffe	BE	54	Oceanic Society Nataly Castelblanco M.
Cuba	Parque Nacional Guanahacabibes	CU	19	Acuario Nacional de Cuba Dorka Cobián Rojas
Puerto Rico	La Parguera	PR	39	Universidad de Puerto Rico Ximena Velez-Suazo

### Recolecta de muestras

Los individuos fueron capturados mediante buceo libre y SCUBA, con hawaianas, a una profundidad de 10 a 20 m. En México se aprovecharon los organismos capturados por el personal técnico de las ANP dentro de los programas de control de pez león.

De cada individuo se cortó aproximadamente 1 g de tejido muscular, se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml con etanol al 96% y se conservó a 4°C hasta la extracción. En el caso de las muestras recolectadas en Puerto Rico, se cortó aproximadamente 3 mm de tejido de la aleta pectoral y se conservó en tubos eppendorf de 1.0 ml con DMSO (Dimetilsulfóxido) a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

### Extracción de DNA

Previo a la extracción, el tejido muscular fue lavado y rehidratado en 600  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O durante una hora. La extracción se realizó usando un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega) de acuerdo al protocolo del fabricante para tejido animal. La cuantificación se realizó usando un fluorómetro (Qubit 2.0, Invitrogen) y la integridad del DNA se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.0% en solución buffer TAE 1X a un voltaje de 100 V durante 1h (Fig. 2), posteriormente se conservó a -20°C hasta su amplificación por PCR.

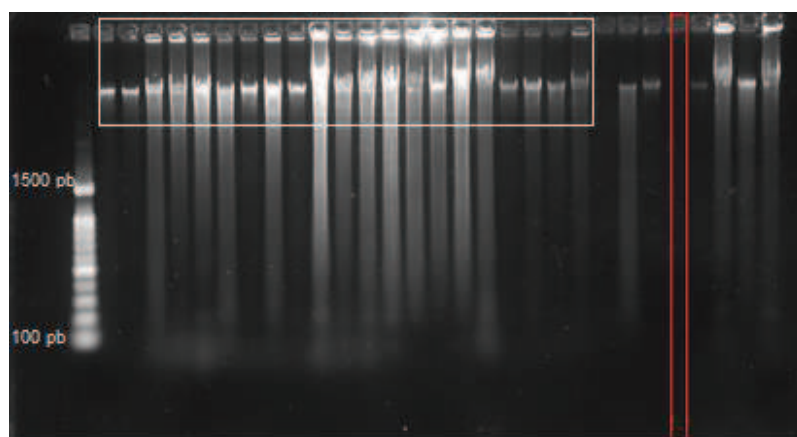


Fig. 2. Visualización de la integridad de DNA de muestras de Puerto Rico. El recuadro blanco muestra ADN de alto peso molecular; el rojo muestra ausencia de DNA en la muestra.

### Amplificación por PCR

Se probaron 23 marcadores ISSR (Integrated DNA Technologies ®) de los cuales cinco fueron seleccionados para el análisis genético de *P. volitans* (Cuadro 2). Para la elección de los marcadores consideramos las siguientes características: número y resolución de bandas, alto polimorfismo y porcentaje medio de guanina-citosina (entre 40 y 60%) (Paris et al., 2010; Casu et al., 2012).

Cuadro 2. Marcadores ISSR seleccionados para el estudio genético de *P. volitans* en el Caribe noroccidental. % GC Porcentaje de guanina-citosina; *Ta*: temperatura de alineamiento; BT: bandas totales; pb: pares de bases. **B** = C, G o T; **D** = A, G o T; **R** = A o G; **W** = A o T; **Y** = C o T.

Marcador (5'→3')	%GC	<i>Ta</i> (°C)	Patrones de amplificación	BT	Intervalo de tamaño (pb)
<b>(GACA)<sub>4</sub>WB</b>	48.1	57	Bueno	18	200-1500
<b>(AG)<sub>8</sub>YC</b>	52.8	58	Bueno	24	200-1500
<b>(CA)<sub>8</sub>AC</b>	50	60	Bueno	17	200-1500
<b>(CA)<sub>8</sub>AG</b>	50	60	Bueno	23	200-1500
<b>(GAG)<sub>5</sub>GC</b>	70.6	63	Bueno	31	400-1400

La amplificación por PCR se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Cruz-Medina (2014), con un volumen de reacción de 15 µl: ~20 ng de DNA molde (2 µl de extracto de ADN), 1.5 µl de 5X Green Buffer (Promega), 200 µM de cada dNTP del dNTP mix (Promega), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1 µM de marcador

(Integrated DNA Technologies®), 1.25 U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) y finalmente el volumen se ajustó con ddH<sub>2</sub>O. La amplificación se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) con el siguiente ciclo: desnaturalización inicial 94°C por 4 min, seguido de 39 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, temperatura de alineamiento entre 57°C y 63°C dependiendo del primer (Tabla 2) y temperatura de extensión de 72°C por 90 s, la extensión final a 72°C durante 10 min.

Los productos PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa 2% en solución buffer TAE 1X (Promega). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) para observar la longitud de los fragmentos separados. La migración en los geles se realizó en celdas horizontales de electroforesis (Sub Cell™ Bio-Rad) a un voltaje constante de 110 V durante 2 horas. Los geles se tiñeron posterior a la electroforesis con solución de GelRed™ (Química Valaner) al 2.5X durante 20 min. Finalmente, cada gel fue visualizado y digitalizado usando un sistema de imagen Alphamager® Mini (ProteinSimple).

### **Análisis de datos moleculares**

La lectura de geles se realizó de forma manual considerando un código binario de presencia (1) y ausencia (0) de banda por individuo. La matriz binaria fue construida a partir de los patrones ISSR y solo se consideraron bandas que presentaron buena resolución asumiendo que cada banda representa un locus distinto.

Para determinar la diversidad genética en las localidades, usamos dos diferentes enfoques:

1) Análisis de frecuencias alélicas. Se estimó el porcentaje de polimorfismo ( $P$ ) por especie y por localidad. Asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg se estimó la heterocigosis total ( $H_T$ ), la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) por localidad y la diversidad genética de Nei ( $h$ ) usando POPGENE 1.32 y GENALEX 6.5 respectivamente (Yeh et al., 1999; Peakall y Smouse, 2006).

2) Análisis bayesianos usando el software HICKORY V1.1, el cual no asume que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Holsinger et al., 2002). Los datos fueron analizados considerando cuatro modelos: i) "full model", donde existe cierta diferenciación poblacional ( $\theta \neq 0$ ) y endogamia ( $f \neq 0$ ); ii) " $f = 0$  model" que asume que no hay endogamia en los grupos estudiados; iii) el " $\theta = 0$  model" en el cual no hay diferenciación genética entre los grupos y, iv) " $f$  free model" o "free model" donde los valores de  $f$  son elegidos aleatoriamente sin previa información. La elección del modelo depende del mejor ajuste a los datos, el cual es determinado por el "Deviance Information Criterion" (DIC) de acuerdo a lo propuesto por los autores (Holsinger y Lewis, 2007). Holsinger et al. (2008) determinaron que los valores más bajos de DIC indican el mejor ajuste al modelo. Luego de la elección del modelo se estimó el promedio de heterocigosis por localidad ( $h_s$ ; parámetro equivalente a heterocigosis esperada por localidad), el promedio de heterocigosis por todas las localidades ( $H_s$ ) y promedio de la heterocigosis, considerando a todas

las localidades como una sola población ( $H_T$  equivalente a la heterocigosis total por especie).

La diferenciación genética entre localidades fue estimada mediante el coeficiente de diferenciación  $G_{ST}$  (Nei, 1973) mediante POPGENE 1.32. Bajo el enfoque bayesiano se estimó  $\theta^{II}$  (análogo del  $G_{ST}$  de Nei). En este estudio seleccionamos  $\theta^{II}$  como el mejor estimador de la diferenciación genética, debido a que este parámetro mide la diferenciación de las frecuencias alélicas en eventos contemporáneos (Holsinger y Lewis, 2007).

Para determinar si existe estructura poblacional se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA;  $P \leq 0.05$ ) usando GENALEX 6.501 (Peakall y Smouse, 2006). Para detectar un posible intercambio genético entre las localidades muestreadas se estimó el flujo génico ( $Nm$ ) entre todas las localidades y por par de localidades con el programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). Posteriormente, se realizó un análisis de aislamiento por distancia para observar la relación entre el flujo génico entre pares de localidades con la distancia geográfica aplicando una regresión de  $\log_{10} Nm$  (flujo génico) vs  $\log_{10} k$  ( $k$  = distancia geográfica en km) (Slatkin, 1993). Para comparar la matriz de distancia genética con la matriz de distancia geográfica se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967;  $P \leq 0.05$ ) con 9999 repeticiones aleatorias en el programa GENALEX 6.501 (Peakall y Smouse, 2006).



Se implementó un modelo de agrupamiento bayesiano en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007). Con este análisis se puede inferir el número óptimo de poblaciones o grupos ( $K$ ) que podemos observar en el muestreo inicial y asignar a los individuos del muestreo a cada uno de estos grupos (Pritchard et al., 2000). En este estudio se eligió el *admixture model*, recomendado como punto de partida para la mayoría de los análisis debido a que proporciona una mejor aproximación a la naturaleza real de los datos bajo el *correlated frequency model*, el cual considera que en poblaciones estrechamente relacionadas las frecuencias alélicas se correlacionan a través de las poblaciones (Pritchard et al., 2000).

## RESULTADOS

### Diversidad Genética

De las 251 muestras colectadas, 189 amplificaron para todos los marcadores ISSR seleccionados. Se identificaron 113 bandas, de las cuales 102 son polimórficas. Únicamente se registró una banda privada en las muestras de Puerto Morelos, México (Cuadro 3, Fig. 3), lo cual corrobora la presencia de *P. volitans* como única especie de pez león en el Caribe.

Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética para *P. volitans* en el Caribe noroccidental. *n*: número de individuos que amplificaron para todos los marcadores,  $B_T$ : número de bandas total por localidad,  $B_{Pol}$ : número de bandas polimórficas,  $B_{Priv}$ : número de bandas privadas.

<b>País</b>	<b>Localidad</b>	<b><i>n</i></b>	<b><math>B_T</math></b>	<b><math>B_{Pol}</math></b>	<b><math>B_{Priv}</math></b>
México	BC	40	109	87	0
	PM	34	113	83	1
	XC	35	108	77	0
Belice	BE	38	112	96	0
Cuba	CU	14	105	79	0
Puerto Rico	PR	28	107	79	0

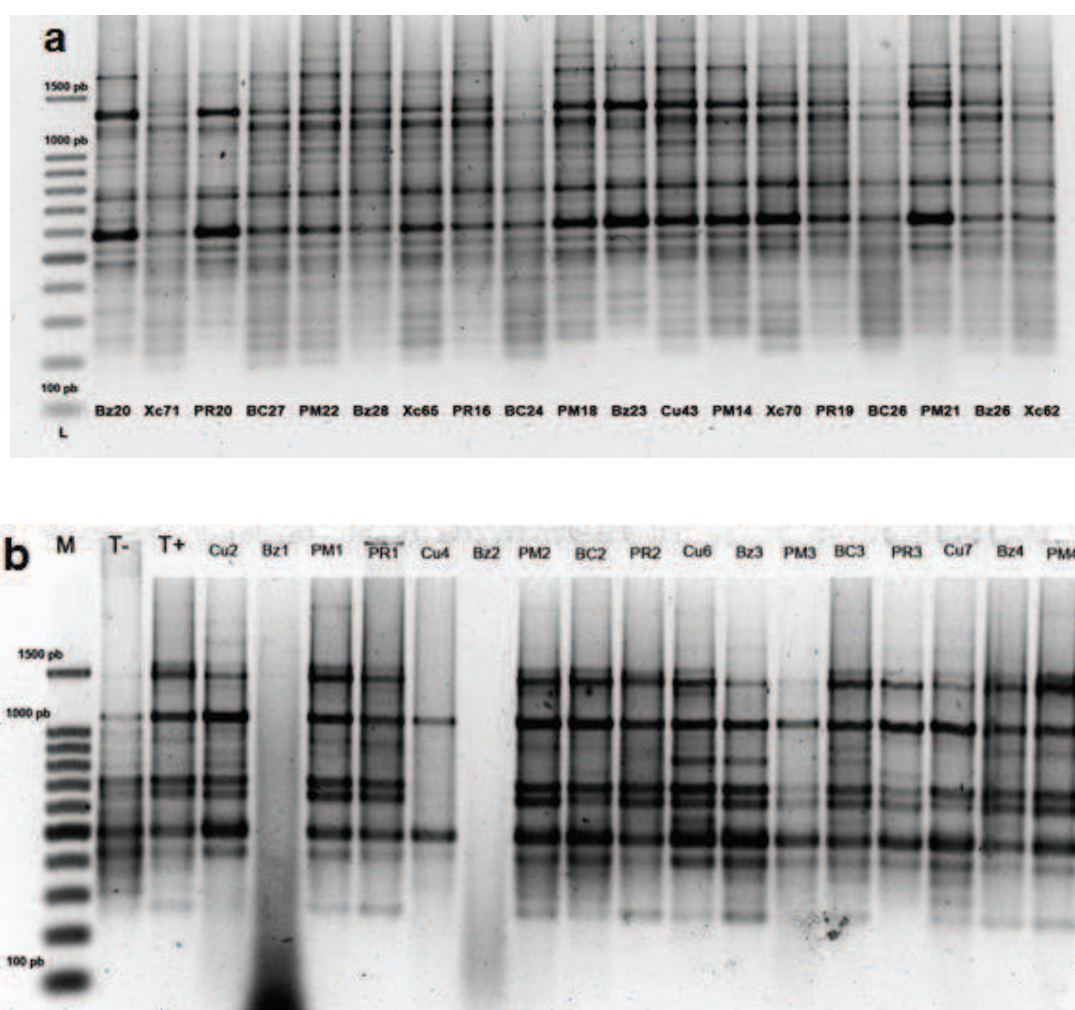


Fig. 3. Perfiles genéticos de *P. volitans* en las seis localidades muestreadas. a) Perfiles obtenidos con el marcador  $(GTG)_5 GC$  y b) Perfiles genéticos obtenidos con el marcador  $(GACA)_4WB$

El porcentaje de polimorfismo ( $P$ ) a nivel de especie fue de 90.2%, con una variación en cada localidad que va de 68% en Xcalak (México) hasta 85% en Belice (Cuadro 4). Bajo la hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosis esperada por especie fue de 0.25 ( $\pm 0.03$  D.S), el promedio de la heterocigosis

esperada ( $He$ ) considerando las seis localidades fue de 0.23 ( $\pm 0.007$  D.S). El índice de diversidad genética de Nei ( $h$ ) fue de 0.25 ( $\pm 0.17$  D.S) en promedio para las seis localidades. Todos los parámetros de diversidad genética mediante el análisis de frecuencias alélicas registran los máximos valores en Belice, mientras que en Xcalak se obtuvieron los valores más bajos (Cuadro 4).

Considerando el método bayesiano, se determinó que el modelo que mejor ajustó a los datos obtenidos fue el *full model* (DIC = 2476.66). El promedio de la heterocigosis por localidad ( $Hs$ ) fue de 0.25 ( $\pm 0.009$  DS) y la heterocigosis total ( $Ht$ ) fue de 0.26 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Parámetros de diversidad genética en *P. volitans*.  $P$ : porcentaje de loci polimórficos;  $h$  diversidad genética de Nei;  $He$  heterocigosis esperada;  $hs$  promedio de heterocigosis por localidad,  $Hs$  heterocigosis promedio y  $Ht$  heterocigosis total.

Localidad	$P$	Frecuencias alélicas		Modelo Bayesiano
		$h$	$He$	$hs$
BC	77	0.24 ( $\pm 0.18$ )	0.24 ( $\pm 0.017$ )	0.25 ( $\pm 0.009$ )
PM	73	0.23 ( $\pm 0.19$ )	0.23 ( $\pm 0.018$ )	0.25 ( $\pm 0.011$ )
XC	68	0.21 ( $\pm 0.19$ )	0.21 ( $\pm 0.019$ )	0.24 ( $\pm 0.011$ )
BE	85	0.26 ( $\pm 0.18$ )	0.26 ( $\pm 0.017$ )	0.27 ( $\pm 0.007$ )
CU	70	0.24 ( $\pm 0.19$ )	0.24 ( $\pm 0.019$ )	0.26 ( $\pm 0.010$ )
PR	70	0.22 ( $\pm 0.19$ )	0.22 ( $\pm 0.019$ )	0.24 ( $\pm 0.010$ )
<b>Promedio (<math>\pm DS</math>)</b>	<b>74</b>	<b>0.25 (<math>\pm 0.17</math>)</b>	<b>0.23 (<math>\pm 0.007</math>)</b>	<b><math>Hs</math> 0.25 (<math>\pm 0.009</math>) <math>Ht</math> 0.26 (<math>\pm 0.009</math>)</b>

### Estructura genética de las localidades

El valor de  $G_{ST}$  (0.0634) y su análogo bayesiano  $\theta^{II}$  ( $0.032 \pm 0.004$  DS) revelaron una ligera diferenciación entre las localidades. Se estimó la endogamia local usando  $f$  como análogo bayesiano para  $F_{IS}$  cuyo valor fue de 0.727 ( $\pm 0.253$  DS). El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró la existencia de una baja, pero significativa, estructura poblacional. Los individuos dentro de las localidades fueron la principal fuente de variabilidad (96%,  $df = 183$ ,  $P = 0.000$ ), mientras que el 4% de la variabilidad resultó de la diversidad entre localidades ( $df = 5$ ,  $p = 0.000$ ).

La prueba de Mantel reveló una ligera correlación positiva y significativa entre las distancias genéticas y geográficas ( $R^2 = 0.0042$ ,  $P = 0.046$ ). El flujo genético ( $Nm$ ) considerando todos los sitios de colecta fue de 7.38. El cuadro 5 muestra el flujo génico y la distancia geográfica entre pares de localidades. Entre los pares de localidades que involucran a Xcalak se reportaron los valores más bajos de  $Nm$ , mientras los valores más altos se observan entre Puerto Rico y dos localidades de México, Banco Chinchorro y Puerto Morelos.

El análisis de aislamiento por distancia entre todas las localidades mostró una leve correlación positiva ( $R^2 = 0.09$ ) entre el flujo génico y la distancia geográfica (Fig. 4).

Cuadro 5. Flujo génico (arriba de la diagonal) y distancia geográfica en km (debajo de la diagonal) entre localidades del Caribe noroccidental

	BC	PM	XC	BE	CU	PR
BC		25.3	12.36	15.77	12.21	33.03
PM	265.44		8.91	13.85	15.91	26.83
XC	67.2	302.43		6.7	6.51	9.85
BE	134.63	407.17	103.03		11.96	12.76
CU	471.97	275.44	533.12	607.47		13.09
PR	2118.63	2086.2	2175.07	2187	1858.13	

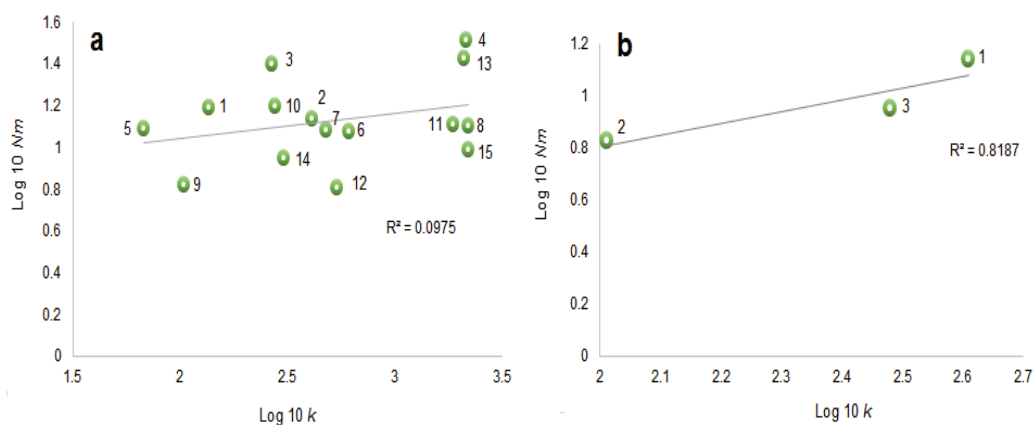


Fig. 4. Análisis de aislamiento por distancia. *Nm*: flujo génico; *k*: distancia geográfica en km. a) Todos los pares de localidades. ( $R^2 = 0.09$ ) y b) Belice-Xcalak (1), Puerto Morelos-Xcalak (2) y Belice-Puerto Morelos (3)

El análisis bayesiano mostró que el número de grupos ( $K$ ) que mejor ajustó al conjunto de datos fue  $K = 3$ . Cada agrupación se caracteriza por un color diferente: el grupo 1 en amarillo, el 2, en verde y el 3 en gris. Con tres agrupaciones, 17.6% del total de los individuos fueron asignados al grupo 1; 36.09% al grupo 2 y 46.30% al grupo 3. El grupo 1 representado principalmente por Belice (mayor dominancia de amarillo). En el grupo dos se observó una dominancia de individuos de Xcalak (dominancia de verde) e incluye a individuos de Cuba y Banco Chinchorro; mientras que el grupo 3 incluye a individuos provenientes de Puerto Morelos y Puerto Rico (dominancia de gris) (Cuadro 6 y Fig. 5). La Fig. 6 muestra la distribución de los diferentes haplotipos en la región del Caribe noroccidental.

Cuadro 6. Proporción de individuos de cada localidad asignados a cada nuevo grupo por el enfoque bayesiano ( $k=3$ ).

<i>Localidad</i>	<i>N</i>	Grupos inferidos ( $Q_i$ )		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
BC	40	0.069	0.470	0.461
BE	38	0.471	0.129	0.400
CU	14	0.267	0.455	0.278
PM	34	0.126	0.211	0.663
PR	28	0.035	0.348	0.617
XC	35	0.104	0.605	0.291

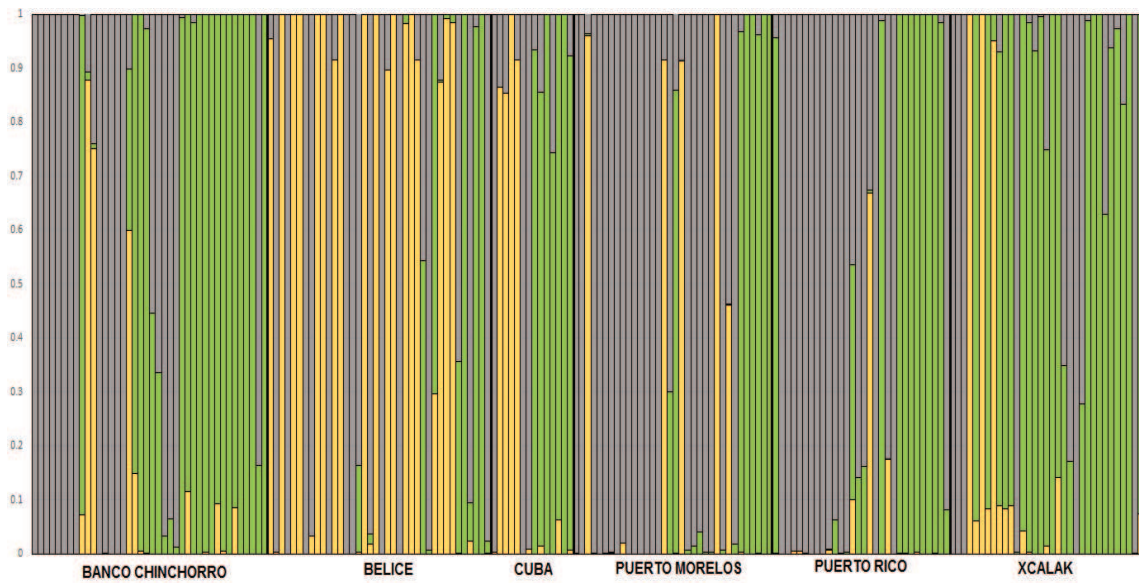


Fig. 5. Gráfico de agrupamiento de individuos de *P. volitans* colectados en seis sitios del Caribe noroccidental según el modelo bayesiano implementado en el programa STRUCTURE considerando  $K = 3$ . Cada individuo es representado por una barra vertical, la cual se divide en diferentes segmentos de colores que representan: grupo 1: amarillo; grupo 2: verde; y grupo 3: gris.



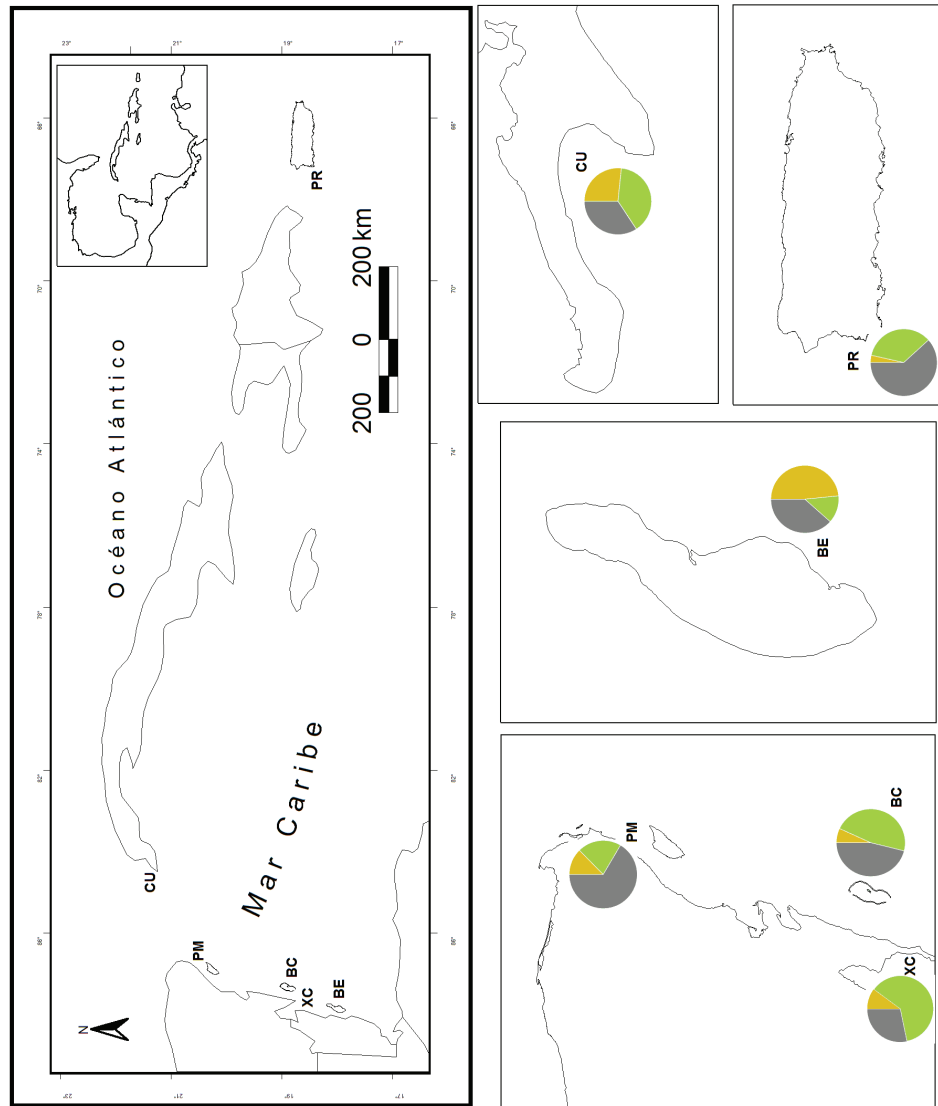


Fig. 6. Distribución de los haplotipos en las seis localidades en el Caribe noroccidental. Belice (BE), Xcalak (XC), Banco Chinchorro (BC), Puerto Morelos (PM), Cuba (CU) y Puerto Rico (PR)

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren la existencia de una sola población a lo largo del Caribe noroccidental. Cada localidad en la cual *P. volitans* se ha establecido se caracteriza por un efecto fundador, lo cual ha provocado bajos niveles de diversidad genética. Se observó también un déficit de heterocigos, explicable por endogamia o efecto Wahlund. Por otro lado, se detectó una ligera pero significativa estructuración de las localidades la cual se explica mediante los patrones de las corrientes marinas en la región. Esta estructuración relaciona a Puerto Rico y Puerto Morelos; a Cuba, Xcalak y Banco Chinchorro, y marcan una ligera diferenciación de Belice

Una limitante del presente estudio fue el bajo número de muestras obtenidas en Cuba, con respecto al número de muestras de otras localidades. En un principio, esta limitante sugiere tomar con cautela los resultados obtenidos para esta localidad, y aumentar el tamaño de individuos analizados; sin embargo al analizar los valores de heterocigosis esperada y porcentaje de polimorfismo no se observó una disminución drástica de estos parámetros, lo que sugiere que a pesar del bajo número de individuos analizados en Cuba se obtuvieron resultados consistentes.

### **Diversidad genética de *P. volitans* en la región del Caribe noroccidental**

Mediante el uso de ISSR *Pterois volitans* presentó un alto porcentaje de polimorfismo, lo cual coincide con lo reportado para *Trachidermus fasciatus* ( $P=$

91.7%) usando el mismo marcador molecular (Bi et al., 2011). No obstante, en otros estudios usando ISSR, *P. volitans* reportó mayor polimorfismo que otras especies de peces como *Cynoglossus semilaevis* ( $P = 45.26\%$ ; Lui et al., 2009), *Hapalogenys nitens* ( $P = 55.17\%$ ; Wang et al., 2007) o *Paralichthys olivaceus* ( $P = 69.57\%$ ; Fang et al., 2006). Cabe destacar que el alto polimorfismo de *P. volitans*, presenta la misma tendencia que otras especies invasoras, como *Athetis lepigone* ( $P=95.08\%$ ) tanto a nivel de especie, como a nivel de poblaciones ( $P=88.52\%$ ) (Chen et al., 2014).

El polimorfismo es una medida de la variación genética (Lowe et al., 2004), por lo que el alto porcentaje de polimorfismo encontrado en *P. volitans* sugiere que la población establecida en el Caribe noroccidental tiene amplia variabilidad genética, lo que podría influir en su éxito invasivo. La variabilidad genética favorece la adaptación frente a los cambios ambientales (Lee., 2002), en el caso las especies invasoras como el pez león, la alta variabilidad genética podría favorecer la adaptación a las nuevas condiciones ambientales fuera de su hábitat nativo.

La heterocigosis esperada en *P. volitans* fue mayor a lo que se reportó en poblaciones sobreexplotadas de *Paralichthys olivaceus*, ( $He = 0.10$ ) usando ISSR (Liu et al., 2006). Este comparativo muestra el efecto de la reducción poblacional en éstas dos especies de peces. En el caso de *P. volitans* se observó que la reducción de heterocigosis esperada debido al efecto fundador no tuvo un impacto tan marcado en comparación al impacto que el cuello de botella tuvo en las poblaciones

de *P. olivaceus*; por lo tanto aunque existe una disminución en la heterocigosis esperada en el pez león no podemos concluir que la disminución es tan drástica que comprometa la persistencia de la especie.

Se ha analizado la heterocigosis esperada en especies de peces invasores usando microsatélites. Por ejemplo, en *Gambusia holbrooki* y *G. affinis*, especies introducidas en Australia, la heterocigosis esperada fue de 0.35 y 0.28 respectivamente (Sanz et al., 2013). En otro estudio con el mismo marcador molecular en especies de *Oreochromis*, el promedio de la heterocigosis esperada fue de 0.70 (Gu et al., 2014). Liang et al. (2009), reportaron un promedio de heterocigosis esperada de 0.64 en *O. niloticus*, y Zhang et al. (2009) encontraron que la heterocigosis esperada en cuatro grupos de *O. aureus* fue de 0.31. Por lo tanto, con base a lo anterior, consideramos que el promedio de la heterocigosis esperada en *P. volitans* es baja en las seis localidades del Caribe noroccidental.

Los valores bajos de diversidad genética encontrados en el Caribe noroccidental son probablemente resultado de un efecto fundador y coinciden con lo que se ha reportado en otras regiones del Caribe como Bahamas, Colombia, Nicaragua, y Puerto Rico (Freshwater et al., 2009; Betancur-R. et al., 2011; Toledo et al., 2014). Sin embargo, se ha documentado que la baja diversidad genética en especies invasoras no limita su éxito invasivo, por ejemplo a pesar de la baja diversidad genética de *Fistularia commersonii*, ha logrado establecerse y dispersarse exitosamente a lo largo del Mediterráneo (Golani et al., 2007).

El análisis mediante el modelo bayesiano indica un valor de heterocigosis total inferior al de la heterocigosis por especie, lo que sugiere un déficit de heterocigos que puede resultar del "allelic dropout"<sup>1</sup>, de la endogamia o del efecto Wahlund (Hassanien y Gilbey, 2005; Manrique-Poyato et al., 2013). Manrique-Poyato et al. (2013) demostraron que el déficit de heterocigos debido al "allelic dropout" detectado mediante ISSR puede ser despreciable.

La reducción de heterocigos en las localidades del Caribe noroccidental puede ser consecuencia de la endogamia causada por un efecto fundador durante el establecimiento de la especie en las diferentes localidades, lo cual concuerda con los altos valores de  $F_{IS}$  reportados en este estudio.

El efecto Wahlund explica la pérdida de heterocigos causada por la subdivisión poblacional. Si una sola población muestreada es en realidad dos o más subpoblaciones, con diferentes frecuencias alélicas, entonces la heterocigosis para cada población se reduce (Hassanien y Gilbey, 2005).

La estimación de la diversidad genética basada en el análisis de frecuencias alélicas considera supuestos distintos a los usados bajo el enfoque bayesiano, por lo que la comparación de los parámetros obtenidos con ambos métodos es de interés. Usando el enfoque bayesiano, la heterocigosis esperada por localidad así

---

<sup>1</sup> Se define como allelic dropout a la falla en la amplificación por PCR de un alelo causada por estocástica (Manrique-Poyato et al., 2013)

como el promedio de heterocigosis considerando las seis localidades presentó valores semejantes a los estimados mediante el análisis de frecuencias alélicas. La poca divergencia en los resultados obtenidos muestra que los enfoques propuestos por Holsinger et al. (2002) y Peakall y Smouse (2006) son adecuados para estimar la diversidad genética usando marcadores dominantes como los ISSR.

### **Estructura poblacional de *P. volitans* en el Caribe noroccidental**

Nuestros resultados sugieren una ligera pero significativa estructura poblacional en la región noroccidental del Caribe con presencia de tres grupos distintos. Esta estructuración geográfica puede ser explicada por factores intrínsecos de la especie como la capacidad de dispersión, el flujo de genes o las características reproductivas (Chang et al., 1997); y por factores ambientales, como las corrientes oceánicas, que influyen sobre la estructura genética de las poblaciones marinas (White et al., 2010).

En el caso particular de *P. volitans* la similitud genética entre las localidades de la región del Caribe puede atribuirse a características biológicas de la especie, como su estrategia de dispersión. *P. volitans* libera masas de huevos flotantes que facilitan su dispersión planctónica; su estadio larval dura en promedio 26 días, lo cual es suficiente para dispersarse a gran distancia de acuerdo a lo documentado por Ahrenholz y Morris (2010) y Vásquez-Yeomans et al. (2011). Así mismo el periodo de desarrollo de huevo a embrión y posteriormente a larva aún no ha sido determinado por lo que la duración completa de la fase de dispersión es aún

desconocida (Morris et al., 2009) por lo tanto no es despreciable que la estrategia de dispersión sea el medio más eficiente de flujo génico entre las localidades.

La conectividad biológica en el Caribe ha sido explicada a partir de varios modelos (Cowen et al., 2002; Paris et al., 2005; Collin, 2010). Uno de los más explicativos es el propuesto por Cowen et al. (2006), ellos sugieren un modelo biofísico para revelar la conectividad biológica dentro del Caribe denominado “*individual based model*” o IBM (por sus siglas en inglés), el cual evaluó la distancia geográfica efectiva entre las poblaciones de pez damisela considerando variaciones espaciales y temporales de las condiciones oceanográficas, así como parámetros biológicos de las larvas.

A partir de la información obtenida por Cowen et al. (2006), así como a las aportaciones de otros trabajos sobre conectividad biológica en la región (Cowen et al., 2002; Paris et al., 2005; Collin, 2010) se plantean dos escenarios que pueden explicar la estructura geográfica de *P. volitans* reportada en este trabajo.

Un primer escenario plantea que la dispersión larval en el Caribe puede ser favorecida por el efecto de las corrientes marinas (Cowen et al., 2002). De acuerdo con los datos genéticos obtenidos, y con base en el patrón de corrientes marinas en la región, sugerimos que el modelo de conectividad en la zona del Caribe noroccidental comienza con huevos o larvas que provienen de la región este de Puerto Rico, las cuales son transportadas por la corriente Ecuatorial del Norte la cual atraviesa entre las Antillas Menores y sigue en dirección al sur de Puerto Rico y

República Dominicana, hasta confluir en el Mar Caribe (PNUMA-PAC, 2007). En el interior del mar Caribe se desarrolla un sistema de corrientes, llamado corriente del Caribe, a través de esta corriente las larvas se dispersan en dirección oeste, hasta incorporarse al Canal de Yucatán (Emilsson, 1971)

Una vez en el Canal, la corriente de Yucatán transporta a las larvas hasta la parte norte de la península, pasando por la costa de Quintana Roo, lo cual explica la similitud genética entre Puerto Morelos y Puerto Rico. En este punto, las larvas pueden seguir diferentes rutas: i) continuar hacia el estrecho de Florida a través corriente del Lazo (Athié, et al., 2011), ii) regresar hacia el Caribe por el canal de Yucatán, lo que favorecería el autoreclutamiento (Athié, et al., 2011) o iii) dirigirse al lado oriental del Canal para incorporarse a un flujo de agua conocido como contracorriente Cubana (Emilsson, 1971; Badan et al., 2005).

Considerando lo anterior y de acuerdo a lo reportado por Cowen et al. (2006) existe poca contribución de las poblaciones de peces provenientes de México a las poblaciones del sur de Florida, por lo que la ruta de dispersión más probable de *P. volitans* al norte de la península de Yucatán es retornar al Caribe o bien incorporarse a la contracorriente Cubana, de esta forma se explica la similitud genética entre las localidades de Xcalak, Banco Chinchorro y Cuba.

El segundo escenario basado en el análisis de la distribución de 25 especies del género *Elacatinus* plantea una ruptura en la conectividad biológica cerca de la



frontera entre México y Belice (Collin, 2010). Este supuesto podría explicar la diferenciación genética de Belice con respecto a las demás localidades.

Este primer estudio a nivel regional permitió un primer acercamiento de la diversidad genética, los patrones de dispersión y conexión genética de *P. volitans* en el Caribe noroccidental. Sugiero ampliar el muestreo al Golfo de México para entender la relación de *P. volitans* entre los dos vertientes de la península de Yucatán así como en Florida, donde empezó la invasión y la diversidad genética podría ser mayor (Freshwater et al., 2009). Propongo también, un monitoreo genético, con ISSR, de las localidades en México para seguir la evolución de la invasión en la región noroccidental del Caribe.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar-Perera, A. y Tuz-Sulub, A., 2010. Non-native, invasive red lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758]: Scorpaenidae), is first recorded in the southern Gulf of Mexico, off the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *Aquatic Invasions*, 2, pp.1-4.
- Aguirre, A., Mendoza, E, y Arredondo, H., 2009. Especies exóticas invasoras: impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía. En: Dirzo, R., González, R. y March, J., comp. *Capital natural de México. Vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 277-318.
- Ahrenholz, D y Morris, J., 2010. Larval duration of the lionfish, *Pterois volitans*, collected from the Bahamian Archipelago. *Environmental Biology of Fishes*, 88(4), pp. 305-309.
- Albins, M. y Hixon, M., 2008. Invasive indo-pacific lionfish *Pterois volitans* reduce recruitment of Atlantic coral-reef fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 367, pp. 233-238.
- Allendorf, .W. y Lundquist, L., 2003. Population Biology, evolution and control of invasive species. *Conservation Biology*, 17, pp. 24-30.

Arias-González, E., González-Gándara, C., Cabrera, L. y Christensen, V., 2011. Predicted impact of the invasive lionfish *Pterois volitans* on the food web of a Caribbean coral reef. *Environmental Research*, 111, pp.917–925.

Athié, G., Candela, J., Sheinbaum, J., Badan, A. y Ochoa, J., 2011. Estructura de la Corriente de Yucatán en los canales de Cozumel y Yucatán. *Ciencias marinas*, 37, pp. 471-492.

Badan, A., Candela, J., Sheinbaum, J. y Ochoa, J., 2005. Upper-layer circulation in the approaches to the Yucatan Channel. En: Sturges W, Lugo-Fernández, A (eds.), *Circulation in the Gulf of Mexico: Observations and Models. Geophysical. Monographic Series*, 161, pp. 57–69.

Badyaev, A., y Martin, T., 2000. Individual variation in growth trajectories: phenotypic and genetic correlations in ontogeny the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Journal of Evolutionay Biology*, 13, pp. 290-301.

Behura, K. 2006 Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, 15, pp. 3087–3113.

Betancur-R., R., Hines, A., Acero, A., Ortí, A., Wilbur, E. y Freshwater, W., 2011. Reconstructing the lionfish invasion: insights into Greater Caribbean biogeography, *Journal of Biogeography*, 38, pp.1281–1293.

Bi, X., Yang, Q., Gao, T. y Li, C., 2011. The loss of genetic diversity during captive

- breeding of the endangered sculpin, *Trachidermus fasciatus*, based on ISSR markers: implications for its conservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(5), pp. 958-966.
- Casu, M., Cossu, P., Lai, T., Scarpa, F., Sanna, D., Dedola, G. y Curini-Galletti, M., 2012. First evidence of self-fertilization in a marine microturbellarian (Platyhelminthes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 428, pp. 32-38.
- Cetina, P., Candela, J., Sheinbaum, J., Ochoa J. y Badan, A. 2006. Circulation along the Mexican Caribbean coast. *Journal of Geophysical Research*, 111, C08021, doi: 10.1029/2005JC003056.
- Chang, Z., Tabashnik, E., Artelt, B., Malvar, T., Ballester, V., Ferre, J., Roderick, K., 1997. Mitochondrial DNA sequence variation among geographic strains of *diamondback moth* (Lepidoptera: Plutellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90 (5), pp. 590–595.
- Chen, F., Ahmed, T., Liu, Y., He, K. y Wang, Z., 2014. Analysis of genetic diversity among different geographic populations of *Athetis lepigone* using ISSR molecular markers. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, pp. 793-798.
- Chevalier, P., Gutiérrez, E., Ibarazal, D., Romero, S., Isla, V., Calderín, J. y Hernández, E., 2008. Primer registro de *Pterois volitans* (Pisces:

Scorpaenidae) para aguas cubanas. *Solenodon*, 7, pp. 37-40.

CONANP, 2000a. Programa de Manejo Reserva de la Biósfera Banco Chinchorro, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, SEMARNAT, México.

CONANP, 2000b. Programa de Manejo Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, SEMARNAT, México.

CONANP, 2004. Programa de manejo del Parque Nacional Arrecifes de Xcalak Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, SEMARNAT, México.

Collin, P., 2010. Fishes as living tracers of connectivity in the tropical western North Atlantic: I. Distribution of the neon gobies, genus *Elacatinus* (Pisces: Gobiidae). *Zootaxa*, 2370, pp. 36-52.

Courtenay, W., 1995. Marine fish introductions in southeastern Florida. *American Fisheries Society Introduced Fish Section Newsletter*, 14, pp. 2-3.

Cowen, R.; Paris, C., Olson, D: y Fortuna, J., 2002. The role of long distance dispersal versus local retention in replenishing marine populations. *Gulf and Caribbean Research Supplement*, pp. 10.

Cowen, R., Paris, C. y Srinivasan, A., 2006. Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, 31, pp. 522-527.

- Cruz-Medina, J., 2014. Optimización de marcadores moleculares ISSR en el caracol rosado *Strombus gigas*. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). México, pp. 44.
- Dunphy, B., y Hamrick, J., 2007. Estimation of gene flow into fragmented populations of *Bursera simaruba* (Burseraceae) in the dry-forest life zone of Puerto Rico. *American Journal of Botany*, 94, pp. 1786–1794.
- Dupont, L., Viard, F., David. P., 2007. Combined effects of bottlenecks and selfing in populations of *Corella eumyota*, a recently introduced sea squirt in the English Channel. *Diversity and Distribution*, 13, pp. 808–817.
- Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X., 2007. *Ecología Molecular*. SEMARNAT, INECOL, UNAM, CONABIO. México, pp. 592.
- Ellstrand, C. y Schierenbeck, A., 2000 Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp. 7043-7050.
- Emilsson I., 1971. Note on the countercurrent in the Yucatan Channel and the western Cayman Sea. *Geofísica Internacional*, 11, pp. 139–149.
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7, pp. 574-578.

- Fang, X., Q. Zhang, J. Qi, Z. Wang y Bao, Z., 2006. RAPD and ISSR analysis on genetic diversity for wild and cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 37(2), pp. 138-142.
- Frankham, R., 2005. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 84, p. 385.
- Freshwater, W., Hamner, M., Parham, S. y Wilbur, E., 2009. Molecular evidence that the lionfishes *Pterois miles* and *Pterois volitans* are distinct species. *Journal of the North Carolina Academy of Science*, 125, pp. 39–46.
- Golani, D., Azzuro, E., Corsini-Foka, M., 2007. Genetic bottlenecks and successful biological invasions: the case of a recent Lessepsian migrant. *Biology Letters*, 3, pp. 541–545.
- González, A. y Aguirre, X., 2007. Inter Simple Sequence Repeat. En Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X., *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT-UNAM, México, pp. 567-571.
- Gu, D. X. Mu, H. Song, D. Luo, M. Xu, J. Luo y Hu, Y., 2014. Genetic diversity of invasive *Oreochromis* spp. (Tilapia) populations in Guangdong province of China using microsatellite markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, pp. 198-204.
- Hamilton, M., 2009. *Population genetics*. Wiley-Blackwell, Nueva York, pp. 422.

- Hamner, M., Freshwater, W. y Whitfield, E., 2007. Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder effects in the western Atlantic. *Journal of Fish Biology*, 71(B), pp. 214-222.
- Hassan, M., M. Harmelin-Vivien y Bonhomme, F., 2003. Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 291(2), pp. 219– 232.
- Hassanien, A. y Gilbey J., 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research*, 36, pp.1450-1457.
- Holsinger, K. y Lewis, P., 2007. Hickory: A Package for analysis of population genetic data v1.1. Department of Ecology and Evolutionary Biology. University of Connecticut, pp. 49.
- Holsinger, K., Lewis, P. y Key, D., 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology*, 11, pp. 1157-1164.
- Hufbauer, R., 2004. Population genetics of invasions: Can we link neutral markers to management? *Weed Technology*, 18, pp. 1522-1527.
- Kristensen, T. y Sorensen A., 2005. Inbreeding-lesson from animal inbreeding, evolutionary biology and conservation genetics. *Journal of Animal Science*,



80, pp. 121-133.

Lawson, H., L. y Estoup, A., 2011. Ecological genetics of invasive alien species. *Biocontrol*, 56, pp. 409–428.

Lee, C. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*, 117(8), pp. 386-391.

Le Roux, J., y Wieczorek, A., 2009. Molecular systematics and population genetics of biological invasions: towards a better understanding of invasive species management. *Annals of Applied Biology*, 154, pp.1–17.

Liu, G., Yu, Z., Bao, L., Bao, B., Sun, X., Shi, Q. y Liu, X., 2008. Population genetics studies of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, pp. 821-827.

Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P., 2004. *Ecological genetics: desing analysis and application*. Blackwell Publishing . Oxford, pp. 326.

Maltagliati, F., Lai, T., Casu, M., Valdesalici S. y Castelli, A., 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(8), pp. 626-634.

Manrique-Poyato, M., López-León, M., Gómez, R., Perfectti, F. y Martínez, P., 2013. Population Genetic Structure of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in

- the South and East of the Iberian Peninsula. *PLOS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0059041.
- Mantel, N., 1967. The detection of diase clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, pp. 209-220.
- Morris, J. y Akins, J., 2009. Feeding ecology of invasive lionfish (*Pterois volitans*) in the Bahamian archipelago. *Environmental Biology of Fishes*, 86, pp. 389-398
- Morris, J., Akins, J. Barse, A., Cerino, D., Freshwater, D., Green, S., Muñoz, R., Paris, C. y Whitfield, P., 2009. Biology and ecology of the invasive lionsfishes *Pterois miles* and *Pterois volitans*. *Proceedings of the 61<sup>st</sup> Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, NOAA.
- Morris, J., 2013. Invasión del pez león: pasado, presente y futuro. En: Morris, J. ed. *El pez león invasor: guía para su control y manejo*. Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Publicación especial, Florida, pp. 126.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivide populations. *Proceeding of the National Academy of Science*, 70, pp. 3321-3323.
- Pappert, R., 2000. Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the southeastern United States. *American Journal of Botany*, 87, pp. 1240-1245.
- Paris, C., Cowen, R., Claro, R. y Lindeman, K., 2005. Larval transport pathways from

- Cuban snapper (Lutjanidae) spawning aggregations based on biophysical modeling. *Marine Ecology Progress Series*, 296, pp. 93-106
- Paris, M., Bonnes, B., Fichelota, G., Poncet B., y Després, L., 2010. Amplified fragments length homoplasy: in silico analysis for model and non-model species. *Genomics*, 11, pp. 287.
- Peakall, R. y Smouse, E., 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, pp. 288-295.
- PNUD-PAC, 2007. Manual de capacitación en el manejo de Áreas Marinas Protegidas. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente- Programa ambiental del Caribe, pp. 446.
- Pradeep, R., N. Sarla y Siddiq, E., 2002. Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) polymorphis and its aplication in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), pp. 9-17.
- Pritchard, K., Stephens, M. y Donnelly, J., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp. 945–959.
- Reznick, D. y Ghalambor, C., 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions thah promote adaptative evolution. *Genetica*, 112, pp.183-198.
- Riquet, F., Daguin-Thiebaut, C., Ballenghien, M., 2013. Contrasting patterns of

- genome-wide polymorphism in the native and invasive range of the marine mollusc *Crepidula fornicata*. *Molecular Ecology*, 22, pp. 1003–1018.
- Rius, M. y Shenkar, N. 2012. Ascidian introductions through the Suez Canal: the case study of an Indo-Pacific species. *Marine Pollution Bulletin*, 64, pp. 2060–2068.
- Rius, M., Turon, X., Bernardi, G., Volckaert, F. y Viard, F., 2014. Marine invasion genetics: from spatio-temporal patterns to evolutionary outcomes. *Biological Invasions*, doi: 10.1007/s10530-014-0792-0.
- Roberts, C., 1997. Connectivity and management of Caribbean coral reefs. *Science*, 278, pp. 1454-1456.
- Roman, J. y Darling, J., 2007 Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *TREE*, 22, pp. 454–464.
- Sakai, K., Allendorf, F., Holt, S., Lodge, D. y Molofsky, K., 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, pp. 305-332.
- Sanz, N., Araguas, R., Vidal, O., Diez-del-Molino, D., Fernández-Cebrián, R. y García-Marín, J., 2013. Genetic characterization of the invasive mosquitofish (*Gambusia* spp.) introduced to Europe: population structure and colonization routes. *Biological Invasions*, 15, pp. 2333-2346.

- Schofield, J., 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, pp. 473-479.
- Schofield, J., 2010. Update on geographic spread of invasive lionfishes (*Pterois volitans* [Linnaeus 1758] and *P. miles* [Bennett 1828]) in the Western North Atlantic Ocean, Caribbean Sea and Gulf of Mexico. *Aquatic Invasions*, 5, pp. 117-122.
- Schultz, T., 1986. *Pterois volitans* and *Pterois miles*: two valid species. *Copeia*, 3, pp. 686–690.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47, pp. 264-279.
- Toledo-Hernández, C., Vélez-Zuazo, X., Ruiz-Díaz, C., Patricio, A., Mège, P., Navarro, M., Sabat, A., Betancur-R. R. y Papa, R., 2014. Population ecology and genetics of the invasive lionfish in Puerto Rico. *Aquatic Invasions*, 9(2), pp. 227-237.
- Tsutsui, D., Suárez, V., Holway, A. y Case, J., 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp. 5948-5953.
- Valdez-Moreno, M., Quintal, C., Gómez, R. y García-Rivas, M., 2012. Monitoring an

alien invasion: ADN barcoding and the identification of lionfish and their prey on coral reefs of the Mexican Caribbean. *PLoS ONE* 6, e36636. doi:10.1371/journal.pone.0036636.

Vásquez-Yeomans, L., Carrillo, L., Estrella Malca, S., Morris, J., Schult, T. y Lamkin, J., 2011. First larval record of *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) collected from ichthyoplankton in the Atlantic. *Biological Invasions*, 13, pp. 2635-2640.

Wang, F., Du, J., Su, Y., Ding, S. y Wang, J., 2007. The genetic structure of nature and reared groups of *Haplogenyis nitens* by ISSR analysis. *Acta Oceanologica Sinica.*, 29(4), pp. 105-110.

White, C., Selkoe, A., Watson, J., Siegel, D., Zacherl, D. y Toonen, R., 2010. Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society*. doi:10.1098/rspb.2009.2214.

Whitfield, E., Gardner, T., Vives, P., Guilligan, R., Courtenay, R., Ray, C. y Hare, A., 2002. Biological invasion of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* along the Atlantic coast of North America. *Marine Ecology Progress Series*, 235, pp. 289-297.

Wink, M., 2006. Use of DNA markers to study birds migration. *Journal of Ornithology*, 147, pp. 234-244.

Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, pp. 97-159.

Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28, pp. 114-138.

Yang, Q., Gao, T. y Miao, Z., 2011. Differentiation between populations of Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) in Northwestern Pacific based on ISSR markers: Implications for biogeography. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, pp. 286-296.

Yeh, C., Yang, R. y Boyle, J., 1999. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129, pp. 157.

Ying, Y., Gao, T. y Miao, Z., 2011. Genetic differentiation of Japanese sardinella (*Sardinella zunasi*) populations in the northwest Pacific revealed by ISSR analysis. *Journal of Ocean University of China*, 10(3), pp. 417-424.

Zhang, T., LU, M.X., YE, X., Quan, Y.C., Gao, F.Y., Huang, Z.H., Bai, J.J., 2009. The genetic structure of four populations of *Oreochromis aureus* by microsatellite DNA analysis. *Acta Hydrobiology Sinica*, 33, 498e508.

# **CAPÍTULO 4**

## **CONCLUSIONES GENERALES**



1. Mediante los resultados obtenidos en el presente trabajo se confirmó que *Pterois volitans* es la única especie de *Pterois* presente en el Parque Nacional Guanahacabibes, Cuba.
2. Las Inter Secuencias Simples Repetidas son una herramienta molecular eficiente y de bajo costo que permite corroborar la identificación de especies, además de ser un marcador molecular de amplia resolución para estudios de genética de poblaciones.
3. La baja diversidad genética de *P. volitans* en la región del Caribe noroccidental coincide con lo reportado para otras regiones del área invadida como Bahamas, Nicaragua, Gran Caimán, Bermudas y Colombia.
3. La baja diversidad genética es consecuencia del efecto fundador. El déficit de heterocigos reportado es explicado por endogamia o por efecto Wahlund.
4. Con respecto a la estructura genética de *P. volitans* en la región del Caribe noroccidental, se encontró que existe una ligera pero significativa estructuración poblacional.
5. La estructura poblacional en la región del Caribe noroccidental puede explicarse por factores propios de la especie, como su estrategia de dispersión, se sugiere que la fase larval es el principal medio de flujo génico entre las localidades.

6. El efecto de las corrientes oceánicas sobre la dispersión larval permite inferir la conectividad entre las localidades de Puerto Rico y Puerto Morelos, así como la similitud genética entre Cuba, Xcalak y Banco Chinchorro. La corriente del Caribe es el principal medio de conectividad en esta región. El retorno de la corriente de Yucatán al Caribe favorece el autoreclutamiento larval al norte de la Península de Yucatán, mientras que la contracorriente cubana permite el ingreso de organismos provenientes de la corriente de Yucatán a Cuba.

7. El aislamiento de Belice y Honduras de la parte norte del Sistema Arrecifal Mesoamericano (Caribe mexicano) explicaría la diferenciación de los individuos de Belice respecto a las demás localidades.

### **Recomendaciones para la investigación futura**

Considero que es indispensable realizar una caracterización genética en todo el archipiélago cubano con el objetivo de contar con una descripción global de la diversidad y estructura genética de la especie en Cuba. Sugerimos corroborar la identificación taxonómica de los individuos capturados en el norte de la isla, debido a que en esta región se reportaron los primeros reportes de la presencia de pez león en Cuba. Además, la cercanía y probable conectividad con Florida y Bahamas es mayor con respecto a la región caribeña.

Se propone aumentar las localidades analizadas, por ejemplo, la parte norte de la Península de Yucatán y el Golfo de México. También se sugiere obtener el

perfil genético o “fingerprint” a partir de los ISSR de individuos de Florida ya que en otros estudios usando la región control del ADN mitocondrial se ha reportado mayor diversidad genética por ser el sitio de origen de la invasión. Esta información permitirá determinar si los ISSR detectan variación en la diversidad genética en el punto inicial de la invasión con respecto a las áreas invadidas posteriormente.

## LITERATURA ADICIONAL

- Chevalier, P. P., 2013. Informe final de proyecto “Estudio preliminar de la presencia del pez león (Teleostei: Scorpaenidae: *Pterois* sp.) en aguas cubanas.” Acuario Nacional de Cuba. Código: DB052, pp. 70.
- Fausch, K., Taniguchi, Y., Nakano, S., Grossman, G. y Townsend, C., 2001. Flood disturbances regimes influence rainbow trout invasion success among five holartic regions. *Ecology Applications*, 11(5), pp. 1438-1455.
- Holland, B., 2000. Genetic of marine bioinvasions. In Sole-Cava, A., C. Russo y J. Thorpe. *Marine Genetics, Developments in Hydrobiology*. Kluwer.
- Molnar, J. L., Gamboa, R. L., Revenga, C. y Spalding, M. D., 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(9), pp. 485-492.
- Stepien, C. y Tumeo, M., 2006. Invasion genetics of Ponto-Caspian gobies in the Great Lakes: a ‘cryptic’ species, absence of founder effects, and comparative risk analysis. *Biological Invasions*, (8): 61–78.
- Williams, J. y Meffe, G., 2005. *Status and trends of the nation’s biological resources: Nonindigenous species*. U.S. Geological Service, Washington, DC, pp. 117-119.