

Genetic connectivity of *Stegastes partitus* in the South Caribbean evidenced by microsatellite analysis

Conectividad genética de *Stegastes partitus* en el Caribe Sur evidenciada por análisis microsatélite

SP Ospina-Guerrero, RM Landinez-García, DJ Rodríguez-Castro, R Arango, E Márquez*

Grupo de Biotecnología Animal, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A No. 63–20, Medellín, Colombia. * E-mail: ejmarque@unalmed.edu.co

Abstract

Bicolor damselfish *Stegastes partitus* (Poey 1986) has been used as a model for studies of the population structure of reef species as an aid for the designing and monitoring of marine protected areas. Studies using allozymes have shown gene flow between populations, but it has been suggested that the lack of structuring could be a consequence of the insensitivity of these markers. We used 11 polymorphic microsatellite loci to evaluate the genetic connectivity of 299 bicolor damselfish from four representative areas of the Colombian coast in the South Caribbean (Santa Marta, Rosario Islands, Capurganá, and San Andrés Island). Genotyping was made using detection by fluorescence of multiple alleles. Genetic differentiation among geographic populations and different oceanographic scenarios was analyzed using the statistic Φ_{ST} and analysis of molecular variance. The correlation between genetic and geographic distance was explored using the Mantel test. All loci were polymorphic, and showed a high number of alleles per locus and heterozygosity deficit with a consequent departure from Hardy-Weinberg equilibrium. We found evidence of gene flow between the geographic and oceanographic populations examined and a lack of correlation between the genetic and geographic distances. The information obtained can be used by the agencies responsible for the design and conservation of marine protected areas and as reference in the monitoring of the genetic diversity and structure of the population under study.

Key words: gene flow, genetic diversity, marine protected areas, bicolor damselfish.

Resumen

La damisela bicolor *Stegastes partitus* (Poey 1986) ha sido utilizada como modelo en estudios de estructura poblacional de especies arrecifales para el diseño y monitoreo de áreas marinas protegidas. Los estudios con aloenzimas reflejan flujo genético entre poblaciones pero se ha sugerido que la ausencia de estructuración puede ser una consecuencia de la insensibilidad de los marcadores utilizados. En el presente trabajo se utilizaron 11 loci microsatélites polimórficos para evaluar la conectividad genética de la damisela bicolor en 299 individuos provenientes de cuatro áreas representativas del sur del Mar Caribe en Colombia (Santa Marta, Islas del Rosario, Capurgana e Isla de San Andrés). La genotipificación se realizó adoptando la metodología de detección por fluorescencia de múltiples alelos. La diferenciación genética entre las poblaciones geográficas y entre los diferentes escenarios oceanográficos se analizó utilizando el estadístico Φ_{ST} y el análisis de varianza molecular. La correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica se exploró mediante el uso de la prueba de Mantel. Todos los loci fueron polimórficos, presentaron elevado número de alelos por locus y déficit de heterocigosidad con consecuente desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. Se encontró evidencia de flujo genético entre las poblaciones geográficas y entre los escenarios oceanográficos analizados y ausencia de correlación entre la distancia genética y la geográfica. La información obtenida puede ser utilizada por las instancias encargadas del diseño y la conservación de áreas marinas protegidas y constituye un punto de partida para el seguimiento de la diversidad genética y la estructura de las poblaciones bajo estudio.

Palabras clave: flujo genético, diversidad genética, áreas marinas protegidas, damisela bicolor.

Introduction

Bicolor damselfish *Stegastes partitus* (Poey 1986) is one of the most abundant species of ichthyic communities in coral reefs from the West Atlantic and Caribbean Sea (Emery 1973). This fish presents a pelagic larval stage with great capacity of movement (Leis 1991, Leis and Stobutzki 1997, Leis and McCormick 2002) and a territorial behavior in adult stages (Harrington 1993). The biology of the species has been widely

Introducción

La damisela bicolor *Stegastes partitus* (Poey 1986) es una de las especies más abundantes de las comunidades ícticas en los arrecifes coralinos del Atlántico occidental y del Caribe (Emery 1973). Presenta un estadio larval pelágico con gran capacidad de movimiento (Leis 1991, Leis y Stobutzki 1997, Leis y McCormick 2002) y en su estado adulto es territorialista (Harrington 1993); su biología básica ha sido ampliamente

studied, and it has been used as a model species in studies related to population structure of reef species with similar life cycles and as an aid in the designing and monitoring of marine protected areas.

Population genetic studies of *S. partitus* have been controversial due to differences in the methodology employed. Evidence obtained from mathematical models based on predictions about circulation, larval transport (Schultz and Cowen 1994, Cowen *et al.* 2000, 2002), and larval behavior (Paris and Cowen 2004) supports the idea of populations with little dispersion (closed populations), while studies using allozymes suggest that the species has high gene flow (open populations) and a common genetic background with high dispersion (Lacson *et al.* 1989, Lacson and Morrizot 1991, Lacson 1992).

Both of these methodological approaches exhibit limitations. For instance, some predictions obtained from mathematical models do not concur with field observations in relation to dispersion distances and larval distribution (Mora and Sale 2002), and in the case of genetic studies, it has been suggested that the lack of structuring in the populations can be a consequence of the insensitivity of the markers employed (Shulman 1998).

This situation stimulated the use of more polymorphic molecular markers in order to analyze the structure of *S. partitus* populations in the southern Caribbean Sea. Studying local populations is important because the population genetics depends not only on the biological knowledge of the species and the physical and oceanographic characteristics of the zone, but also on the spatial and temporal scale where the populations are analyzed (Mora and Sale 2002). In this study, the genetic diversity and the influence of some oceanographic and geographic characteristics on the gene flow of *S. partitus* populations from four representative coral reef areas in the southern Caribbean were analyzed using 11 microsatellite *loci*.

Material and methods

Sample collection

A total of 299 specimens of *S. partitus* were captured in four Colombian coral reef areas influenced by different oceanographic conditions in the southern Caribbean Sea: San Andrés Island (Hans Key, Barco Hundido, and San Luis), Rosario Islands (Majayura, Isla Pirata, Punta Brava), Santa Marta (Cinto, Punta Betín, Playa del Pozo), and Capurganá (Isla Narza, El Aguacate, Cabo Tiburón) (table 1, fig. 1). Samplings were carried out in the opposite direction of the regional oceanographic currents during October 2004, except in the case of Punta Betín, where captures were made before and after this month.

Samples were collected by autonomous diving immersions, placing a plastic bag of 80 × 60 cm² on top of the territory of each fish and provoking defensive responses until it was contained in the bag. A sample of 1 cm² of caudal fin or muscle tissue was taken from each specimen collected and preserved

estudiada, por lo que ha sido utilizada como modelo en estudios de estructura poblacional de especies arrecifales con ciclos de vida similares para el diseño y monitoreo de áreas marinas protegidas.

Los estudios de la estructura poblacional de *S. partitus* han sido controvertidos dependiendo de la metodología utilizada. Las evidencias obtenidas a partir de modelos matemáticos basados en predicciones sobre circulación, transporte de larvas (Schultz y Cowen 1994, Cowen *et al.* 2000, 2002) y comportamiento larval (Paris y Cowen 2004), apoyan la idea de poblaciones poco dispersas (poblaciones cerradas), mientras que los estudios con aloenzimas apoyan la idea de poblaciones con alto flujo genético (poblaciones abiertas) y un acervo genético común geográficamente extenso con altas tasas de dispersión (Lacson *et al.* 1989, Lacson y Morrizot 1991, Lacson 1992).

Ambas aproximaciones metodológicas presentan limitaciones. Por ejemplo, se ha dicho que algunas predicciones de los modelos matemáticos no concuerdan con las observaciones en el campo en cuanto a las distancias de dispersión y distribución de larvas (Mora y Sale 2002), y en el caso de los estudios genéticos, se ha sugerido que la ausencia de estructuración puede ser una consecuencia de la insensibilidad de los marcadores utilizados (Shulman 1998).

Lo anterior motivó, en este estudio, el uso de marcadores más polimórficos para analizar la estructura de las poblaciones de *S. partitus* en el sur del Mar Caribe. El estudio de las poblaciones locales es importante porque no sólo depende del comportamiento biológico de la especie y las características físicas y oceanográficas locales, sino también de la escala espacial y temporal en las que son analizadas las poblaciones (Mora y Sale 2002). En este trabajo se analizó la diversidad genética y la influencia de algunas características oceanográficas y geográficas sobre el flujo genético de poblaciones de *S. partitus* provenientes de cuatro áreas coralinas representativas del sur del Mar Caribe, mediante el análisis de 11 *loci* microsatélite.

Materiales y métodos

Recolección de la muestra

Se capturaron 299 individuos de *S. partitus* en cuatro áreas colombianas de arrecifes coralinos del sur del Caribe influenciadas por diferentes condiciones oceanográficas: Isla de San Andrés (Hans Key, Barco Hundido y San Luis), Islas del Rosario (Majayura, Isla Pirata, Punta Brava), Santa Marta (Cinto, Punta Betín, Playa del Pozo) y Capurganá (Isla Narza, El Aguacate, Cabo Tiburón) (tabla 1, fig. 1). El muestreo se realizó en sentido contrario al sistema de corrientes oceanográficas de la región, durante octubre de 2004, excepto en el caso de Punta Betín, sitio para el que se obtuvieron capturas previas y posteriores.

Las capturas se hicieron durante inmersiones de buceo autónomo colocando una bolsa plástica de 80 × 60 cm² encima del territorio de cada pez y provocando respuestas defensivas hasta introducirlos en la bolsa. De los individuos recolectados

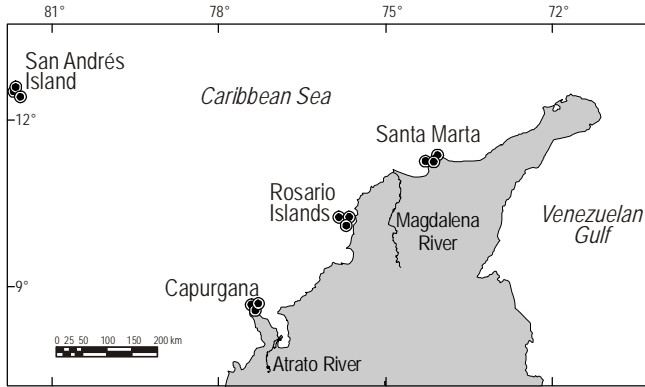


Figure 1. Geographic location of four coral reef areas in the South Caribbean (Colombia). Circles indicate the sites where *Stegastes partitus* was collected.

Figura 1. Localización geográfica de las cuatro áreas coralinas en el Caribe Sur (Colombia). Los círculos indican los sitios donde se realizaron las recolecciones de *Stegastes partitus*.

in DMSO (Carlo Erba, Milan, Italy) until DNA extraction in the laboratory.

Microsatellite analysis

Preserved tissues were washed with distilled water and ground. The DNA was extracted following the protocol for isolating high molecular weight DNA from mammalian cells described by Sambrook *et al.* (1989), with a modification during the protein precipitation stage when a mix of chloroform:isoamyl alcohol was used (24:1, Merck, Darmstadt, Germany, and JT Baker, Phillipsburg, USA). Fluorescent quantification of DNA was done with a commercial kit (Bio-Rad, Philadelphia, USA). Eleven primers and amplification conditions previously reported by Williams *et al.* (2003) were used with modifications in the annealing temperature and $MgCl_2$ concentrations as described below.

Amplification reactions were performed in a final volume of 10 μL 1X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, and 500 mM KCl), 3 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs (Invitrogen, California, USA), 0.5 μM of each primer, 2% formamide (Amresco, Ohio, USA), 0.04 U recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen, California, USA), and 30 ng μL^{-1} of template DNA. Each forward primer was fluorescently labelled with Cy 5.0 or Cy 5.5 (MWG Biotech, Atlanta, USA).

Amplification reactions were programmed in a thermocycler (Biometra T3 Thermoblock, Göttingen, Germany) with a slope of 2 seconds and PCR thermal cycling as follows: one cycle at 92°C for 60 seconds, 30 cycles at 92°C for 10 seconds, 10 seconds at specific annealing temperature for each primer (62°C for *SpAAC41* and *SpGATA40*; 59°C for *SpAAC42*, *SpAAT39*, and *SpAAT40*; 58°C for *SpGATA16*, *SpAAC33*, *SpAAT9*, and *SpAAC47*; 57°C for *SpAAT33*; and 52°C for *SpAAC46*), and 10 seconds at 72°C, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes.

se tomó 1 cm^2 de aleta caudal y/o músculo y se preservó en DMSO hasta la extracción de ADN en el laboratorio.

Análisis de microsatélites

El tejido preservado se lavó con agua destilada y se maceró, y el ADN se extrajo siguiendo el protocolo para aislamiento de ADN de mamífero de alto peso molecular descrito por Sambrook *et al.* (1989), con una modificación en la etapa de precipitación proteica en la cual se utilizó cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, Merck, Darmstadt, Alemania, y JT Baker, Phillipsburg, EUA). La cuantificación se realizó con el kit Fluorescent DNA Quantitation (Bio-Rad, Filadelfia, EUA). Se utilizaron los 11 cebadores y condiciones de amplificación previamente publicados por Williams *et al.* (2003) con modificaciones en la temperatura de alineamiento y las concentraciones de $MgCl_2$.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 10 μL , con amortiguador PCR 1X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4 y KCl 500 mM), 3 mM de $MgCl_2$, 0.1 mM de dNTPs (Invitrogen, California, EUA), 0.5 μM de cada uno de los cebadores, 2% de formamida (Amresco, Ohio, EUA), 0.04 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, California, EUA) y 30 ng μL^{-1} de ADN molde. El cebador derecho de todos los pares de cebadores fue marcado fluorescentemente con Cy 5.0 o Cy 5.5 (MWG Biotech, Atlanta, EUA).

Las reacciones de amplificación fueron programadas en un termociclador Biometra T3 Thermoblock (Göttingen, Alemania) con una pendiente de dos segundos y un perfil térmico que consistió de un ciclo a 92°C por 60 segundos, seguido por 30 ciclos de 10 segundos a 92°C, 10 segundos de alineamiento a la temperatura específica de cada cebador (62°C para *SpAAC41* y *SpGATA40*, 59°C para *SpAAC42*, *SpAAT39* y *SpAAT40*, 58°C para *SpGATA16*, *SpAAC33*, *SpAAT9* y *SpAAC47*, 57°C para *SpAAT33* y 52°C para *SpAAC46*) y 10 segundos a 72°C antes de la extensión final a 72°C por 10 minutos.

La desnaturalización del amplificado se realizó incubando a 80°C por 3 min una mezcla 1:1 del producto PCR con amortiguador desnaturalizante (99% formamida, Amresco, Ohio, y 0.1% azul de bromofenol Sigma, San Luis, Missouri, EUA). Los fragmentos se separaron en un secuenciador automático de ADN (Susol *et al.* 2000), Long-Read Tower System de Visible Genetics, Microcell 500, empleando SureFill al 6%, 1400 V, 56°C de temperatura del gel, 50% de poder del láser, un segundo de lectura en una corrida de una hora y en presencia de TBE 1 X. El tamaño de cada amplificado se determinó con el software Gene Objects (versión 3.0 de Visible Genetics), utilizando dos controles internos (241 y 250 bp o 167 y 180 bp) que migraban con cada una de las muestras. La muestra se consideró heterocigota cuando la altura máxima del pico menor fue superior al 70% de la altura máxima del pico mayor, en caso contrario o cuando un solo pico estuvo presente se consideró homocigota (Butler 2001). La detección de posibles

Table 1. Some oceanographic characteristics of the coral reef areas examined in the South Caribbean (Colombia). * Protected area of the Old Providence McBean Lagoon National Park since 1995 and Seaflower Biosphere Reserve since 2000, and Protected Marine Area since 2005; ** protected area of the Corales del Rosario and San Bernardo del Viento National Park since 1977, and Protected Marine Area since 2005; *** protected area of the Tayrona National Park since 1969. CHD: continental hydric discharges; OCS: oceanographic current systems; ECA: extent of coralline area. Information taken from Díaz *et al.* (2000).

Tabla 1. Algunas características oceanográficas de las áreas evaluadas en el Caribe Sur (Colombia). * Área protegida por el Parque Nacional Natural Old Providence McBean Lagoon desde 1995, la Reserva de Biosfera Seaflower desde 2000 y el Área Marina Protegida desde 2005; ** área protegida por el Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo del Viento desde 1977 y el Área Marina Protegida desde 2005; *** área protegida por el Parque Nacional Natural Tayrona desde 1969. CHD: descargas hídricas continentales, OCS: sistema de corrientes oceanográficas, ECA: extensión del área coralina. Datos tomados de Díaz *et al.* (2000).

Coralline area	Geographical coordinates		CHD	OCS	ECA (km ²)
	Latitude	Longitude			
San Andrés Island*	-81.6889	12.5517	Absent	Anticyclonic gyre	97.5
	-81.7370	12.5401			
	-81.7163	12.5269			
Capurganá	-77.3415	8.6337	Atrato River	Panama-Colombia Countercurrent	3.5
	-77.3245	8.6083			
	-77.3586	8.6591			
Rosario Islands**	-75.7031	10.0965	Magdalena River	Panama-Colombia Countercurrent	145.3
	-75.7244	10.1025			
	-75.7252	10.1873			
Santa Marta***	-74.0600	11.3358	Magdalena River	Central Caribbean Current	9.3
	-74.0814	11.3296			
	-74.2240	11.2544			

Denaturation of the amplified products was performed by incubation at 80°C for 3 minutes in a 1:1 mix of the PCR product with denaturing buffer (99% formamide, Amresco, Ohio, and 0.1% bromophenol blue, Sigma, St. Louis, USA). Fragments were separated in a DNA automated sequencer (Visible Genetics Long-Read Tower System, MicroCell 500) (Susol *et al.* 2000), using SureFill 6%, 1400 V, 56°C gel temperature, 50% laser power, one second for reading, and running for one hour in the presence of TBE 1 X. Fragment sizes were determined using the Gene Objects software (Visible Genetics, version 3.0), using two internal controls of 241 and 250 bp or 167 and 180 bp, which co-migrated with each sample. A sample was considered heterozygote when the lower peak represented more than 70% of the higher peak, while in the opposite case or when only one peak was observed it was considered homozygote (Butler 2001). Detection of possible genotyping mistakes were made with the Micro-Checker software (Oosterhout *et al.* 2004).

Data analysis

Genetic diversity was estimated for the total population and for each subpopulation by calculating the average number of alleles per *locus*, number of polymorphic *loci*, observed average heterozygosity, expected average heterozygosity, and fixation index using the GenAIEx software, version 6.0 (Peakall and Smouse 2006). The following three diversity

errores de genotipificación se realizó en el programa Micro Checker (Oosterhout *et al.* 2004).

Análisis de datos

La diversidad genética se estimó en la población total y en cada una de las subpoblaciones mediante el cálculo del promedio de alelos por *locus*, el número de *loci* polimórficos, la heterocigosidad media observada, la esperada, y el índice de fijación, utilizando el programa GenAIEx versión 6.0 (Peakall y Smouse 2006). También se calcularon tres índices de diversidad: α (Fisher *et al.* 1943), H' (Shannon y Weaver 1964) y S (Simpson 1949) con el programa EstimateS versión 7.0 (Colwell 2005). Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se estimaron con el programa Arlequín versión 2000 (Schneider *et al.* 1997) utilizando la prueba exacta de Guo y Thompson (1992), cadenas de Markov con 1000 repeticiones y ajustando los valores de significancia con la prueba de Bonferroni (Rice 1989).

Para evaluar la diferenciación genética de la población total, entre pares de poblaciones y entre escenarios oceanográficos se utilizó el estadístico Φ_{ST} y el análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) del programa GenAIEx versión 6.0 (Peakall y Smouse 2006). La diferenciación genética debida al aislamiento por distancia se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de rangos de Spearman y la significancia se determinó con 999 permutaciones usando el

indexes were calculated using EstimateS, version 7.0 (Colwell 2005): alpha (Fisher *et al.* 1943), H' (Shannon and Weaver 1964), and S (Simpson 1949). Departures from Hardy-Weinberg equilibrium were estimated with Arlequin version 2000 (Schneider *et al.* 1997), using Guo and Thompson's (1992) exact test, Markov chains with 1000 replications, and adjusting significance values with the Bonferroni test (Rice 1989).

To analyze the genetic differentiation of the total population, between pair-wise populations and among oceanographic scenarios, we used the statistic Φ_{ST} and analysis of molecular variance (Excoffier *et al.* 1992) included in the GenAlEx software, version 6.0 (Peakall and Smouse 2006). Genetic isolation by distance was evaluated calculating the Spearman rank correlation coefficient, and statistical significance was performed with 999 permutations using the Mantel test included in GenAlEx, version 6.0 (Peakall and Smouse 2006).

Results

All *loci* were polymorphic. Allele size ranged from 71 to 337 bp and the average number of alleles per locus was 31 ± 6 (range of 21 to 42), with *SpGATA40*, *SpAAT9*, *SpAAT39*, and *SpAAC41* exhibiting higher polymorphism level (table 2). The average number of alleles per locus per subpopulation was 16.25 (range of 15 to 17) (table 2). All microsatellite *loci* examined appeared to present heterozygosity deficit with a consequent departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.001$; tables 2, 3). The four locations examined showed similarities in levels of polymorphism, heterozygosity deficit, and in the value of the three diversity indexes (α , H', and S), even though each of these indexes give different weights to richness and allelic frequency (table 3).

procedimiento de Mantel (Mantel 1967), del programa GenAlEx versión 6.0 (Peakall y Smouse 2006).

Resultados

Todos los *loci* fueron polimórficos, presentaron un tamaño alélico que varió desde 71 hasta 337 bp y un promedio de 31 ± 6 alelos/*locus* (rango 21 a 42), de los cuales *SpGATA40*, *SpAAT9*, *SpAAT39* y *SpAAC41* presentaron el mayor nivel de polimorfismo (tabla 2). El promedio de alelos por *locus* por población fue de 16.25 (rango 15 a 17) (tabla 3). Todos los *loci* microsatélite evaluados presentaron déficit de heterocigosidad con la consecuente desviación del equilibrio Hardy-Weinberg ($P < 0.001$; tablas 2, 3). Las cuatro áreas examinadas presentaron similitud en el grado de polimorfismo, el déficit de heterocigosidad y en los valores de los tres índices de diversidad (α , H' y S), a pesar de que éstos ponderan de manera diferente la riqueza y la frecuencia alélica (tabla 3).

En la población total el estadístico $\Phi_{ST} = 0.001$ no fue significativamente diferente de cero ($P = 0.074$), lo que indica ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones de esta región. Este resultado fue similar a lo encontrado cuando se realizaron las comparaciones por pares de subpoblaciones distanciadas geográficamente y por escenarios oceanográficos (tabla 4). No se encontró correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica ($R_{xy} = 0.019$, $P = 0.250$).

Discusión

En este estudio se encontró evidencia de flujo genético entre poblaciones de *S. partitus* en el sur del Mar Caribe analizando 11 *loci* polimórficos de ADN microsatélite. La muestra

Table 2. Genetic diversity detected in 11 microsatellite *loci* of *Stegastes partitus* from the South Caribbean (Colombia). N: number of specimens examined; Na: total number of alleles per *locus*; Ra: range of allele size in base pairs; H_O: observed average heterozygosity; H_E: expected average heterozygosity; F: fixation index. * Statistical departure from Hardy-Weinberg equilibrium at $P < 0.01$.

Tabla 2. Diversidad genética en 11 *loci* microsatélite de la población de *Stegastes partitus* en el Caribe Sur (Colombia). N: número de individuos muestreados; Na: número total de alelos por *locus*; Ra: rango de tamaño de alelo en pares de bases; H_O: heterocigosidad observada; H_E: heterocigosidad esperada; y F: índice de fijación. * Desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg a $P < 0.01$.

Microsatellite locus	N	Na	Ra	H _O	H _E	F
<i>SpGATA40</i>	284	42	117–337	0.70	0.96	0.27*
<i>SpAAT9</i>	285	39	97–214	0.27	0.96	0.72*
<i>SpAAT39</i>	270	35	123–228	0.32	0.95	0.66*
<i>SpAAC41</i>	289	31	130–247	0.56	0.95	0.41*
<i>SpAAC46</i>	276	31	176–305	0.43	0.93	0.54*
<i>SpGATA16</i>	275	31	94–274	0.72	0.94	0.24*
<i>SpAAT33</i>	234	30	109–223	0.16	0.95	0.83*
<i>SpAAC42</i>	289	29	69–156	0.62	0.94	0.33*
<i>SpAAC33</i>	294	25	71–158	0.34	0.92	0.63*
<i>SpAAC47</i>	268	25	80–155	0.74	0.92	0.19*
<i>SpAAT40</i>	289	21	128–212	0.46	0.92	0.50*

Table 3. Genetic diversity of four populations of *Stegastes partitus* from the South Caribbean (Colombia). N: number of specimens examined; Na: average number of alleles per locus; H_O : observed average heterozygosity; H_E : expected average heterozygosity; F: fixation index; α : Fisher's diversity index; H' : Shannon's diversity index; S: Simpson's diversity index. * Statistical departure from Hardy-Weinberg equilibrium at $P < 0.01$.

Tabla 3. Diversidad genética de cuatro poblaciones de *Stegastes partitus* en el Caribe Sur (Colombia). N: número de individuos; Na: promedio de alelos por locus; H_O : heterocigosidad media observada; H_E : heterocigosidad media esperada; F: índice de fijación; α : índice de diversidad de Fisher; H' : índice de diversidad de Shannon; S: índice de diversidad de Simpson. * Desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg a $P < 0.01$.

Coralline areas	N	Na	H_O	H_E	F	α	H'	S
San Andrés Island	75	17	0.49	0.91	0.46*	32.29	5.00	123.19
Rosario Islands	76	17	0.46	0.91	0.49*	31.12	5.00	126.73
Capurganá	68	16	0.50	0.91	0.45*	29.01	4.94	119.73
Santa Marta	60	15	0.47	0.90	0.48*	27.51	4.90	114.64

In the total population, the statistic $\Phi_{ST} = 0.001$ was not statistically different to zero ($P = 0.074$), indicating lack of genetic differentiation among populations in this region. The same result was obtained when comparisons were performed among geographic population or oceanographic scenarios (table 4). Correlation between genetic and geographic distance was not observed ($R_{xy} = 0.019$, $P = 0.250$).

Discussion

In this study, the analysis of 11 polymorphic microsatellite loci revealed evidence of gene flow among populations of *S. partitus* from the South Caribbean. The population sample used is probably representative of the genetic diversity of the species in this region if both number of specimens and areas examined are considered. The ranges of allele size and average number of alleles per locus (table 3) were similar to those previously reported by Williams *et al.* (2003) of 77–337 and 31 ± 9 , respectively. In the present study, however, heterozygosity deficit was found in all the loci examined, whereas Williams *et al.* (2003) only found this phenomenon in 5 of the 11 loci examined.

Deficit of heterozygosity has been reported in other studies where automated microsatellite genotyping was performed (Butler 2001), and it has been attributed to an underestimation of heterozygotes as a consequence of stutter products (Shinde *et al.* 2003), dominance of short alleles (Wattier *et al.* 1998), or presence of null alleles (Shaw *et al.* 1999). It has been suggested that these genotyping errors can be detected by the available softwares that employ different approaches. In this particular study, the data analysis using the Micro-Checker software (Oosterhout *et al.* 2004) indicated the presence of null alleles in the 11 loci or the possibility of stutter bands in 7 of these loci. The possibility of getting null alleles in 11 loci of 299 specimens seems unlikely because it would mean that about 40% of the heterozygotes must have one mutation in the annealing site of the primers that were specifically developed for this species.

Another possibility is that the heterozygosity deficit could be a consequence of biological processes such as the Wahlund effect, inbreeding, or assortative mating. The Wahlund effect probably does not explain these results because of the lack of

probablemente fue representativa de la diversidad genética de la especie en esta región, teniendo en cuenta el número de individuos analizados y las áreas evaluadas. El rango de tamaño de alelos y el promedio de alelos por locus (tabla 3) fueron similares a los previamente reportados por Williams *et al.* (2003), los cuales fueron de 77–337 y 31 ± 9 , respectivamente. Sin embargo, en el presente estudio se encontró déficit de heterocigosidad en todos los loci evaluados, mientras que en el trabajo de Williams *et al.* (2003) este comportamiento se presentó en cinco de los loci examinados.

El déficit de heterocigosidad ha sido reportado en otros trabajos donde se realizó genotipificación automatizada de microsatélites (Butler 2001) y ha sido explicado por la subestimación de alelos como consecuencia de la omisión de picos considerados como fantasmas (Shinde *et al.* 2003), la dominancia de alelos pequeños (Wattier *et al.* 1998) o la presencia de alelos nulos (Shaw *et al.* 1999). Se ha propuesto que estos errores de genotipificación pueden ser detectados por programas de computador con diferentes aproximaciones. En el caso particular del programa Micro Checker (Oosterhout *et al.* 2004), el análisis de los datos de este estudio indica la presencia de alelos nulos en los 11 loci o la posibilidad de eliminar picos fantasmas en siete de estos loci. Sin embargo, la alternativa de presentar alelos nulos en 11 loci de 299 individuos parece poco probable porque esto implicaría que cerca del 40% de los heterocigotos presentaron una mutación en el sitio de anclaje de cebadores que fueron desarrollados específicamente para esta especie.

La otra posibilidad es que el déficit de heterocigosidad se deba a procesos biológicos tales como el efecto Wahlund, endogamia o apareamiento asociativo. El efecto Wahlund probablemente no explica estos datos debido a que no se encontró diferenciación genética entre poblaciones que habitan en diferentes condiciones oceanográficas ni entre poblaciones geográficamente distanciadas entre 227 y 832 km (tabla 4). Sin embargo, estos resultados podrían ser consecuencia de procesos endogámicos aun cuando no puede descartarse la existencia de apareamiento asociativo debido al comportamiento sexual de la especie que involucra varios aspectos en la selección del macho por parte de la hembra tales como la producción de sonido (Myrberg *et al.* 1986, Kenyon 1994, Myrberg 1997, Mann y Lobel 1997), el cuidado parental (Knapp y Warner 1991), la tasa de cortejo y las reservas de energía

genetic differentiation among these populations from different oceanographic conditions and separated geographically by 227 to 832 km (table 4). These results could therefore be attributed to inbreeding, though it is not possible to discard assortative mating as a result of the sex behavior of this species, where females select males based on several characteristics such as sound production (Myrberg *et al.* 1986, Kenyon 1994, Myrberg 1997, Mann and Lobel 1997), male parental care (Knapp and Warner 1991), courtship rate and energy reserves (Knapp and Kovach 1991, Knapp 1995), egg survival (Knapp 1993), and parasite presence (Robinson 2005). Additional studies are required to clarify these last two hypotheses.

It has been suggested that the lack of genetic structuring among populations is a consequence of the insensitivity of the allozyme markers (Shulman 1998). In this study, however, evidence of gene flow was also found using neutral and polymorphic molecular markers able to detect more recent genetic diversity events. Taken together, all the genetic results obtained in this study suggest that *S. partitus* from the Caribbean probably constitutes one population with gene flow. This contradicts the mathematical modeling studies performed for this species in other Caribbean regions, which suggest that these populations are closed (Schultz and Cowen 1994; Cowen *et al.* 2000, 2002; Paris and Cowen 2004).

This last discrepancy could suggest that the connectivity patterns are very complex and probably involve not only some aspects of the species's life strategies (pelagic larvae with great capacity of movement), but also factors such as hurricanes, oceanographic movement or other rare events of dispersion that have not been considered in modeling studies and could permit the connectivity observed in the genetic studies.

The role of life strategy in the connectivity pattern is supported by the observation that in the same oceanographic scenario, microsatellite analysis evidenced gene flow in the

(Knapp y Kovach 1991, Knapp 1995), la supervivencia de los huevos (Knapp 1993) y la presencia de parásitos (Robinson 2005); pero se requieren trabajos adicionales que permitan aclarar estas dos últimas hipótesis.

Se ha sugerido que la falta de estructuración genética entre poblaciones se debe a la insensibilidad de los marcadores aloenzimáticos utilizados (Shulman 1998). Sin embargo, en el presente estudio también se encontró evidencia de flujo genético utilizando marcadores moleculares neutros y altamente polimórficos, capaces de detectar eventos recientes de diversidad genética. Los resultados genéticos en conjunto sugieren que las poblaciones de *S. partitus* del Caribe probablemente conforman una población con flujo genético, en contraste con los estudios de modelación matemática que se han realizado para esta misma especie en otras regiones del Caribe, en donde se sugiere que las poblaciones probablemente son cerradas (Schultz y Cowen 1994; Cowen *et al.* 2000, 2002; Paris y Cowen 2004).

La discrepancia anterior podría sugerir que los patrones de conectividad son bastante complejos y probablemente no sólo involucran aspectos de la estrategia de vida de las especies (larva pelágica con gran capacidad de movimiento), sino también algunos factores como huracanes, movimientos oceanográficos u otros eventos raros de dispersión, que no han sido considerados en los estudios de modelación y pueden estar permitiendo la conectividad encontrada en los estudios genéticos.

El papel de la estrategia de vida en los patrones de conectividad está apoyado por la observación de que, en el mismo escenario oceanográfico, el análisis de microsatélites evidenció flujo genético en la especie territorial *S. partitus* examinada en el presente estudio y estructuración genética en la especie demersal *Lutjanus synagris* (Landínez-García 2007). La estructuración genética también se ha detectado en la especie pelágica *Coryphaena hippurus* usando RFLP del gen

Table 4. Estimators of genetic flow between pair-wise *Stegastes partitus* populations and among oceanographic scenarios in the South Caribbean (Colombia).

Tabla 4. Estimadores del flujo genético entre los pares de poblaciones de *Stegastes partitus* y entre los escenarios oceanográficos en el Caribe Sur (Colombia).

	Coralline areas	Φ_{ST}	P
Geographic populations (geographic distance)	San Andrés Island–Santa Marta (832 km ²)	0.0020	0.096
	San Andrés Island–Capurganá (656 km ²)	0.0020	0.112
	San Andrés Island–Rosario Islands (700 km ²)	0.0020	0.119
	Rosario Islands–Capurganá (245 km ²)	0.0020	0.127
	Rosario Islands–Santa Marta (227 km ²)	0.0010	0.222
	Santa Marta–Capurganá (471 km ²)	0.0000	0.484
Oceanographic scenarios	Anticyclonic gyre	0.0017	0.059
	Panama-Colombia Countercurrent	0.0004	0.361
	Atrato River	0.0020	0.127
	Central Caribbean Current	0.0004	0.336
	Magdalena River	0.0010	0.222

territorial species *S. partitus* examined here, as well as genetic structuration in the demersal species *Lutjanus synagris* (Landínez-García 2007). Genetic structure has also been detected in the pelagic species *Coryphaena hippurus* using RFLPs of the mitochondrial gene NADH1 (Rocha *et al.* 2006). All this suggests that the results obtained in the present study are probably not a consequence of the molecular markers employed. Nevertheless, monitoring gene flow at spatial and temporal scales is recommended to discard the possibility that these data reflect circumstantial evidence of connectivity.

Despite the differences in extension, current systems, continental hydric discharges, and protection categories (table 2), the four coral reef areas examined showed a similar level of genetic diversity. It is therefore important to try to maintain the present levels of connectivity. It is also important to undertake studies in order to estimate the effective population size necessary to detect populations that may not counteract the effects of genetic drift or lack of gene flow (Lacy 1987), and to keep in mind other adverse factors such as sickness (Schmale *et al.* 2002) or catastrophic events (Lacson and Morizot 1991) that could represent a threat for these populations due to synergistic effects.

Acknowledgements

This study was partially supported by the Colombian Institute for the Development of Science and Technology “Francisco José de Caldas” (Colciencias; grant No. 1118-09-13537, contract 181/2003) and the National University of Colombia at Medellín. The authors thank the divers, fishermen, Colombian Institute for Rural Development at San Andrés, and the Special Management Unit of the Colombian National Park System (Caribbean section) for assistance during the collection of samples.

References

- Butler J. 2001. Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers. Academic Press, London, 322 pp.
- Colwell R. 2005. User’s guide to EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Ver. 7.0.
- Cowen R, Lwiza K, Sponaugle S, Paris C, Olson D. 2000. Connectivity of marine populations: Open or closed. *Science* 287: 857–859.
- Cowen R, Paris C, Olson D, Fortuna J. 2002. The role of long distance dispersal versus local retention in replenishing marine populations. *Gulf Caribb. Res.* 14: 129–137.
- Díaz J, Barrios L, Cendales M, Garzón-Ferreira J, Geister J, López-Victoria M, Ospina G, Parra-Velandia F, Pinzon J, Vargas-Ángel B, Zapata F, Zea S. 2000. Áreas Coralinas de Colombia. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andreis” INVEMAR, Santa Marta, Colombia, 176 pp.
- Emery A. 1973. Atlantic bicolor damselfish (Pomacentridae): A taxonomic question. *Copeia* 1973: 590–594.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- mitochondrial NADH1 (Rocha *et al.* 2006), sugiriendo que los resultados no son probablemente una consecuencia de los marcadores genéticos utilizados. Sin embargo, sería recomendable monitorear el flujo genético espacial y temporal para descartar la posibilidad de que los datos reflejen evidencias circunstanciales de conectividad.
- A pesar de las diferencias en la extensión coralina, el sistema de corrientes, las descargas hídricas continentales y las categorías de protección (tabla 2), las cuatro áreas coralinas evaluadas presentaron niveles semejantes de diversidad genética, por lo que sería conveniente realizar esfuerzos por mantener los niveles de conectividad actual. También sería recomendable adelantar estudios que permitan estimar el tamaño efectivo poblacional para detectar poblaciones que no podrían contrarrestar los efectos de la deriva en ausencia de flujo genético (Lacy 1987) y no perder de vista factores adversos como enfermedades (Schmale *et al.* 2002) o eventos catastróficos (Lacson y Morizot 1991) que podrían convertirse en una amenaza para estas poblaciones del Caribe por el efecto sinérgico.

Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (proyecto 1118-09-13537, contrato 181/2003) y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Los autores agradecen a los buzos, los pescadores, el Instituto Colombiano de Desarrollo Rural, seccional San Andrés y la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales, territorial Caribe, los cuales colaboraron en la recolección de las muestras biológicas.

- Fisher R, Corbet A, Williams C. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Anim. Ecol.* 12: 42–58.
- Guo S, Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361–372.
- Harrington M. 1993. Aggression in damselfish: Adult-juvenile interactions. *Copeia* 1993: 67–74.
- Kenyon T. 1994. The significance of sound interception to males of the bicolor damselfish, *Pomacentrus partitus*, during courtship. *Environ. Biol. Fish.* 40: 391–405.
- Knapp R. 1993. The influence of egg survivorship on the subsequent nest fidelity of female bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. *Anim. Behav.* 46: 111–121.
- Knapp R. 1995. Influence of energy reserves on the expression of a secondary sexual trait in male bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. *Bull. Mar. Sci.* 57: 672–681.
- Knapp R, Kovach J. 1991. Courtship as an honest indicator of male parental quality in the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. *Behav. Ecol.* 2: 295–300.
- Knapp R, Warner R. 1991. Male parental care and female choice in the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*: Bigger is not always better. *Anim. Behav.* 41: 747–756.
- Lacson J. 1992. Minimal genetic variation among samples of six species of coral reef fishes collected at La Parguera, Puerto Rico, and Discovery Bay, Jamaica. *Mar. Biol.* 112: 327–331.

- Lacson J, Morizot D. 1991. Temporal genetic variation in sub-populations of bicolor damselfish (*Stegastes partitus*) inhabiting coral reefs in the Florida Keys. *Mar. Biol.* 110: 353–357.
- Lacson J, Riccardi V, Calhoun S, Morizot D. 1989. Genetic differentiation of bicolor damselfish (*Eupomacentrus partitus*) populations in the Florida Keys. *Mar. Biol.* 103: 445–451.
- Lacy R. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conserv. Biol.* 1: 143–158.
- Landínez-García R. 2007. Análisis genético de *Lutjanus synagris* en poblaciones del Caribe colombiano. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Leis J. 1991. The pelagic stage of reef fishes: The larval biology of coral reef fishes. In: Sale P (ed.), *The Ecology of Fishes on Coral*. Academic Press, San Diego, pp. 183–230.
- Leis J, Stobutzki I. 1997. Swimming performance of late pelagic larvae of coral-reef fishes: *In situ* and laboratory-based measurements. *Proc. 5th Indo-Pacific Fish Conference* 1: 575–583.
- Leis J, McCormick M. 2002. The biology, behavior, and ecology of the pelagic, larval stage of coral reef fishes. In: Sale P (ed.), *Coral Reef Fishes*. Elsevier Science, pp. 171–199.
- Mann D, Lobel P. 1997. Propagation of damselfish (Pomacentridae) courtship sounds. *J. Acoust. Soc. Am.* 101: 3783–3791.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209–220.
- Mora C, Sale P. 2002. Are populations of coral reef fish open or closed? *Trends Ecol. Evol.* 17: 422–428.
- Myrberg Jr A. 1997. Sound production by a coral reef fish (*Pomacentrus partitus*): Evidence for a vocal, territorial “keep-out” signal. *Bull. Mar. Sci.* 60: 1017–1025.
- Myrberg A, Moler M, Catala J. 1986. Sound production by males of a coral reef fish (*Pomacentrus partitus*): Its significance to females. *Anim. Behav.* 34: 913–923.
- Oosterhout C, Hutchinson W, Willis D, Shipley P. 2004. Micro Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Paris C, Cowen R. 2004. Direct evidence of a biophysical retention mechanism for coral reef fish larvae. *Limnol. Oceanogr.* 49: 1964–1979.
- Peakall R, Smouse P. 2006. GenA1Ex version 6.0: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288–295.
- Rice W. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Robinson, M. 2005. Role of the isopod *Anilocra partiti* in the health, behavior and mating success of the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. Ph.D. thesis, University of Miami.
- Rocha A, Bobadilla M, Ortega S, Saavedra S, Sandoval JR. 2006. Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del Pacífico. *Cienc. Mar.* 32: 569–578.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schmale M, Gibbs P, Campbell C. 2002. Virus-like agent associated with neurofibromatosis in damselfish. *Dis. Aquat. Org.* 49: 107–115.
- Schneider S, Kueffer J, Roessli D, Excoffier L. 1997. A software package for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. Arlequin, version 2000.
- Schultz E, Cowen R. 1994. Recruitment of coral-reef fishes to Bermuda: Local retention or long distance dispersal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 109: 15–28.
- Shannon C, Weaver W. 1964. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, 125 pp.
- Shaw P, Pierce G, Boyle P. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA Markers. *Mol. Ecol.* 8: 407–417.
- Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31: 974–980.
- Shulman M. 1998. What can population genetics tell us about dispersal and biogeographic history of coral-reef fishes? *Aust. J. Ecol.* 23: 216–225.
- Simpson E. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Susol E, Eyre S, John S. 2000. High-throughput genotyping of microsatellite markers. In: Hajeer A, Worthington J, John S (eds.), *SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis*. Eaton Publishing, Natick, MA, pp. 85–126.
- Wattier R, Engel C, Saumitou-Laprade P, Valero M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Mol. Ecol.* 7: 1569–1573.
- Williams D, Purcell J, Hughes C, Cowen R. 2003. Polymorphic microsatellite loci for population studies of bicolor damselfish, *Stegastes partitus* (Pomacentridae). *Mol. Ecol. Notes* 3: 547–549.

*Recibido en marzo de 2007;
aceptado en marzo de 2008.*