




NOTA / NOTE:


Amplificación cruzada de microsatélites en dos especies de haemúlidos (*Haemulon aurolineatum* y *Haemulon steindachneri*)

Cross amplification of microsatellites in two haemulid species (*Haemulon aurolineatum* and *Haemulon steindachneri*)

Paula E. Pabón Quintero¹; José Julián Tavera²; Ana María Millán-Márquez² y Arturo Acero P.¹

 0000-0003-1800-9073

 0000-0003-4517-9238

 0000-0001-8975-1115

 0000-0002-6637-9901

¹Instituto de Estudios en Ciencias del Mar, Cecimar, Universidad Nacional de Colombia sede Caribe, Calle 25 No. 2-55, Playa Salguero, Santa Marta, Colombia. Playa Salguero, Santa Marta, Colombia. pepabonq@unal.edu.co, aacerop@unal.edu.co.

²Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Calle 13 # 100-00. Cali, Colombia. jose.tavera@correounivalle.edu.co, millan.ana@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Las investigaciones genético-poblacionales en peces marinos han permitido estudiar los patrones de dispersión y la conectividad entre los hábitats. Dentro de esos estudios una herramienta importante son los marcadores moleculares tipo microsatélite. La amplificación cruzada de microsatélites es un método que consiste en usar cebadores diseñados para una especie en otra especie filogenéticamente cercana. Debido a la necesidad de realizar estudios de genética de poblaciones en especies de importancia pesquera se evaluaron y diseñaron cebadores para las especies *Haemulon aurolineatum* y *Haemulon steindachneri*. Se recolectaron muestras producto de la pesca artesanal en Barú-Colombia. Se estandarizó la amplificación de 12 microsatélites de los cuales 10 loci para *H. aurolineatum* y 9 loci para *H. steindachneri* fueron polimórficos. Se considera que los cebadores implementados en este estudio son útiles para futuros estudios de flujo génico en estas especies.

PALABRAS CLAVE: Haemulidae, Roncos, Cebadores, Polimorfismo, Genética de poblaciones.

ABSTRACT

Genetic-population studies in marine fish have allowed to study patterns of dispersal and connectivity between habitats. One important tool in population genetics is the use of microsatellite molecular markers. Cross-amplification of microsatellite is a method that consists in using primers designed for one species in a different one but phylogenetically related. Because of the importance of genetic studies of populations in artisanal fisheries species, primers were evaluated and designed for the species *Haemulon aurolineatum* and *Haemulon steindachneri*. Samples were collected from the artisanal fisheries in Barú-Colombia. Amplification was standardized for 12 microsatellites which ten were polymorphic for *H. aurolineatum* and nine for *H. steindachneri*. It is considered that the primers implemented in this study are useful for future studies of gene flow in these species.

KEYWORDS: Haemulidae, Grunts, Primers, Polymorphism, Population genetics

DOI: 10.25268/bimc.invemar.2018.47.1.743

Publicado por INVEMAR

Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual

Published by INVEMAR

This is an open Access article under the CC BY-NC-SA

Los estudios de variación genética entre poblaciones de peces marinos han permitido dilucidar aspectos de su dispersión y de la conectividad entre los hábitats en los que se distribuyen. Los marcadores moleculares son una herramienta de gran importancia para identificar dicha variabilidad genética, entre ellos los microsátélites, secuencias de repeticiones en tándem de ADN nuclear, han sido ampliamente utilizados. por su alto polimorfismo, herencia mendeliana y codominancia (Selkoe y Toonen, 2006). Para el uso de microsátélites es necesario realizar su aislamiento, lo cual es un proceso largo, dispendioso y costoso, por lo que para diversas investigaciones es preferible probar cebadores diseñados para especies filogenéticamente cercanas, teniendo en cuenta que las regiones flanqueantes a los microsátélites pueden ser altamente conservadas entre especies pertenecientes a un mismo género o familia (Rico *et al.*, 1996; Barbará *et al.*, 2007). Este proceso se denomina amplificación cruzada, pero no siempre resulta exitoso, pues depende de factores como el nivel de polimorfismo, la unidad de repetición de los cebadores, y la cercanía filogenética de las especies en que es implementado. En algunas ocasiones, microsátélites específicos al ser probados en otra especie del mismo género o familia no presentan el mismo nivel de polimorfismo, son monomórficos o presentan problemas de amplificación (Landínez-García *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2011; Fresneda-Rodríguez *et al.*, 2013; Almanza *et al.*, 2016).

El género *Haemulon*, perteneciente a la familia Haemulidae, es de gran importancia ecológica y económica en los arrecifes del Nuevo Mundo (Rocha *et al.*, 2008). Ha sido empleado como modelo para analizar hipótesis evolutivas, de especiación y generación de diversidad en el Caribe (Rocha *et al.*, 2008; Tavera *et al.*, 2012, 2018). Sus especies presentan una amplia distribución geográfica y habitan ambientes contrastantes (Tavera *et al.*, 2012). Entre los haemúlidos, dos especies representativas son *Haemulon aurolineatum* y *H. steindachneri*, las cuales son un objetivo importante en la pesca artesanal en el Caribe sur.

Hasta el momento se han diseñado 11 pares de cebadores (Williams *et al.*, 2004), los cuales se estandarizaron y fueron utilizados como una herramienta en el análisis genético poblacional de *H. flavolineatum* (Purcell *et al.*, 2006). El objetivo de este estudio fue diseñar cebadores para ocho secuencias de microsátélites de *H. aurolineatum* previamente registradas en GenBank por Turner *et al.* (2005) y estandarizar las condiciones de amplificación de los cebadores diseñados por Williams *et al.* (2004) en las especies *H. aurolineatum* y *H. steindachneri*. La implementación de

Studies of genetic variation among marine fish populations have allowed aspects of their dispersal and the connectivity among their habitats to be elucidated. Molecular markers are a very important tool for identifying such genetic variability that includes microsattellites, which are sequences of tandem repeats of nuclear DNA that have been widely used for their high degree of polymorphism, Mendelian inheritance and codominance (Selkoe and Toonen, 2006). However, to be used, microsattellites must be isolated, which is a long and expensive process; therefore, for certain investigations, it is often preferable to test primers that have been designed for other, phylogenetically close species because the regions flanking the microsattellites can be highly conserved among species belonging to the same genus or family (Rico *et al.*, 1996; Barbará *et al.*, 2007). This process is called cross-amplification, but it is not always successful because it depends on factors such as the level of polymorphism, the unit of primer repetition and the phylogenetic closeness of the species in which it is implemented. In some cases, specific microsattellites tested in another species of the same genus or family do not present the same level of polymorphism, are monomorphic or are difficult to amplify (Landínez-García *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2011; Fresneda-Rodríguez *et al.*, 2013; Almanza *et al.*, 2016).

The genus *Haemulon*, which belongs to the family Haemulidae, is of great ecological and economic importance in the reefs of the New World (Rocha *et al.*, 2008), and it has been used as a model to analyze evolutionary hypotheses, speciation and diversification in the Caribbean (Rocha *et al.*, 2008, Tavera *et al.*, 2012, 2018). The species of the genus have a wide geographical distribution and inhabit contrasting environments (Tavera *et al.*, 2012). Among haemulids, two representative species are *Haemulon aurolineatum* and *Haemulon steindachneri*, which are important targets in artisanal fisheries in the southern Caribbean.

To date, 11 pairs of primers have been designed (Williams *et al.*, 2004) that have been standardized and used in the population genetic analysis of *Haemulon flavolineatum* (Purcell *et al.*, 2006). The aim of this study was to design primers for eight microsattellite sequences of *H. aurolineatum* previously registered in GenBank by Turner *et al.* (2005) and to standardize the amplification conditions of the primers designed by Williams *et al.* (2004) between *H. aurolineatum* and *H. steindachneri*.

los microsatélites registrados en el presente estudio permite responder, con gran resolución, preguntas relacionadas con la diversidad y estructura genética de las dos especies, utilizando una estrategia más rápida y económica que la de aislar los microsatélites de forma específica.

En abril de 2016 se recolectaron individuos de *H. aurolineatum* (n=30) y *H. steindachneri* (n=30) en las faenas de pesca realizadas por los pescadores artesanales, en Barú-Colombia (10°12'37"N, 75°34'45"W). La extracción y purificación del ADN se realizó mediante el protocolo de extracción de Salting-out propuesto por Alhjanabi y Martínez (1997). La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó por medio del Nanodrop 2000 (Termo Scientific, EE. UU.).

El diseño de los cebadores para las secuencias Hau034, Hau075, Hau183, Hau220, Hau315, Hau417, Hau462 y Hau474 se realizó con en el programa Geneious 9.0 (Drummond *et al.*, 2010) (Tabla 1). Además de los oligonucleótidos anteriores se seleccionaron seis pares de cebadores diseñados por Williams *et al.* (2004) para *H. flavolineatum*, teniendo en cuenta el nivel de polimorfismo y la composición de la unidad de repetición. A los cebadores *forward* de cada microsatélite durante la PCR se hibridizó la secuencia universal M13 con fluorocromos (PET, NED, VIC y FAM) en el extremo 5' para la genotipificación (Schuelke, 2000).

Using the microsatellites developed in the present study allows us to answer, with great resolution, questions related to the diversity and genetic structure of these two species, using a more efficient and cost-effective strategy than isolating microsatellites specific to each species.

In April 2016, *H. aurolineatum* (n = 30) and *H. steindachneri* (n=30) individuals were collected by artisanal fishermen in Barú-Colombia (10°12'37"N, 75°34'45"W). DNA extraction and purification were carried out using the salting-out extraction protocol proposed by Alhjanabi and Martínez (1997), and DNA quality was evaluated by electrophoresis in 1% agarose gel and quantified by means of a Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA).

The primers for the Hau034, Hau075, Hau183, Hau220, Hau315, Hau417, Hau462 and Hau474 sequences were designed with the program Geneious 9.0 (Drummond *et al.*, 2010) (Table 1). In addition to the above oligonucleotides, six pairs of primers designed by Williams *et al.* (2004) for *H. flavolineatum* were selected accounting for the level of polymorphism and the composition of the repeat unit. During PCR, the *forward* primers of each microsatellite were hybridized to the universal M13 sequence with fluorochromes (PET, NED, VIC and FAM) at the 5' end for genotyping (Schuelke, 2000).

Tabla 1. Características de los microsatélites estandarizados. Rep: Motivo de repetición %G-C: Porcentaje de Guanina-Citosina. TA: Temperatura alineamiento en °C. Los superíndices al lado de cada locus indican la amplificación cruzada específica. ^A *Haemulon aurolineatum*; ^B *Haemulon steindachneri*.

Table 1. Characteristics of standardized microsatellites. Rep: Nucleotic repetition; %GC: Guanine-cytosine percentage; TA: Temperature alignment in °C. The superscripts next to each locus indicate the specific cross-amplification. ^A *Haemulon aurolineatum*; ^B *Haemulon steindachneri*.

Autor Author	Loci	Rep.	Secuencias primer Primer sequences	%GC	TA (°C)
El presente estudio (2017) This study (2017)	Hau034	CA ₁₆	F: FAM-M13-ACACTCATAACATTTGCTGCAGG	45	
			R: TGAGCTGTTCTGATGGACCG	55	
	Hau075	CA ₁₃	F: NED-M13-ATCTTGACATGCACACGGG	55	56
			R: CTCTGAGCTCGTCTTCAGCC	60	
	Hau183 ^{A,B}	TG ₁₃	F: NED-M13-TGGTTCACATGTGTATGTTGTGTC	41.7	56
			R: AACTCTGGTGTGGGTTACC	55	
	Hau220 ^{A,B}	TG ₉	F: NED-M13-CAGCACAACACCAGGGTTTATG	50	56
			R: TTCACTCTGCTCAGCTGCTC	55	
	Hau315 ^{A,B}	CA ₁₁	F: FAM-M13-TGCAGAAAGACTCTGAGGTG	50	56
			R: GACACAGCTGGTAGTCAGGG	60	
	Hau417 ^{A,B}	AC ₁₂	F: VIC-M13-TGAGCTGACGAGATACACGC	55	56
			R: TGTGATGCTCGTCACCTCTG	55	
	Hau462 ^{A,B}	GT ₁₂	F: PET-M13-GCGCTTGTGCACATTTGCTC	55	56
			R: TGCGTAGGTTAACTTTCCACATG	43.5	
Hau474 ^{A,B}	AC ₈	F: VIC-M13-TGGTAACATTTCCCTGGCTCTG	50	56	
		R: CAGTGGCAACTTCACCTTG	55		

Autor Author	Loci	Rep.	Secuencias primer Primer sequences	%GC	TA (°C)
Williams <i>et al.</i> (2004)	HfAAC3-B ^A	AC7GC(AC) ₁₀	F: PET-M13-GCTCCATGCTGAATGTGAT	47.4	52
			R: ATGGTCTGTGTCTTGAGTCTGT	45.4	
	HfAAC10-C ^A	AC ₂₁	F: FAM-M13-CACGGAGAAAGGAATAGCAT	45	52
			R: TGGCAGAGAGAGAGGTTTCA	50	
	HfAAC37-C ^B	AC ₁₅	F: VIC-M13-CCAGCAGAGGAGGTGAGAC	63	52
			R: CCGCTGTTTCCAATTTATCT	40	
	HfAAC41-A	AC ₂₇	F: PET-M13-TCTGCTGTTTACTTTTTCTCTGTC	37.5	49
			R: CAGCCCTCGATACAAGTTCA	50	
	HfAAC43-C ^{A,B}	GT11AT(GT) ₁₄	F: FAM-M13-CTGCCTGTGTGGACAAAA	47.4	53
			R: CGTGAGTCAAACATACACTGA	41	
	HfAAC54-A ^{A,B}	GT ₁₃	F: NED-M13-GACGCAGCATGAATTAATAAC	40	49
			R: GCTGGTCTACGACGAGATG	58	

La estandarización de las condiciones adecuadas de amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de los microsatélites se realizó usando un termociclador ProFlex (Life Technologies). El programa de PCR estuvo basado en las condiciones requeridas para la hibridación del cebador universal M13; un ciclo a 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 15 s, TA:48- 60°C por 15 s, 72°C por 45 s, 94°C por 15 s; 8 ciclos de 53°C por 5 s, 72°C por 45 s; un ciclo de 72°C por 15 min y un ciclo a 15°C por 15 min. Las concentraciones finales de cada reactivo fueron 1X Buffer BD, 0.3mM de dNTPs, 1.5mM de MgCl₂, 0.25 μM de Cebador M13 (NED, VIC, PET o FAM), 0.25μM de cebador-*reverse*, 0.06 de cebador-*forward*, 1U de Taq polimerasa. Los microsatélites Hf AAC37 y HfAAC3 requirieron una mezcla de 1X de Buffer BD, 0.3mM de dNTPs, 2.5mM de MgCl₂, 0.16 μM de Cebador M13 + (NED, VIC, PET o FAM), 0.16μM de Cebador-R, 0.04 de cebador-F, 0.5U/μl de Taq polimerasa. El volumen final de la reacción fue 10 μl. La verificación de las amplificaciones se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa a 2.5%. Los productos de PCR obtenidos de dichas pruebas fueron analizados por medio de electroforesis capilar en el secuenciador ABI3130 y la genotipificación se realizó con el programa Geneious 9.0 (Drummond *et al.*, 2010).

Para detectar posibles errores de genotipificación (presencia de alelos nulos) se usó el programa Micro Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) con 1000 simulaciones Bootstrap con un nivel de confianza de 95%. Se estimó la desviación del equilibrio Hardy Weinberg (EHW) por medio de la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995a) implementado en el programa GENEPOP v4.2 con 1000 interacciones de Monte Carlo MCMC. El desequilibrio de ligamiento se estimó con el test de probabilidad de Fisher (Raymond y Rousset,

The adequate conditions for PCR amplification of the microsatellites were standardized using a ProFlex thermal cycler (ThermoFisher Scientific). The PCR program was based on the conditions required to hybridize the universal M13 primer: one cycle at 94°C for 2 min; 30 cycles of 94°C for 15 s, TA: 48-60°C for 15 s, 72°C for 45 s, 94°C for 15 s; 8 cycles of 53°C for 5 s, 72°C for 45 s; a cycle of 72°C for 15 min and a cycle at 15°C for 15 min. The final concentrations of each reagent were 1X BD buffer, 0.3 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 μM Primer M13 (NED, VIC, PET or FAM), 0.25 μM reverse primer, 0.06 forward primer and 1 U of Taq polymerase. The HfAAC37 and HfAAC3 microsatellites required a mixture of 1X BD buffer, 0.3 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.16 μM Primer M13 (NED, VIC, PET or FAM), 0.16 μM Primer-R, 0.04 Primer-F and 0.5 U/μl Taq polymerase. The final reaction volume was 10 μl. Verification of the amplifications was performed by electrophoresis in 2.5% agarose gel. The PCR products from these tests were analyzed by capillary electrophoresis in an ABI3130 sequencer, and genotyping was performed with the program Geneious 9.0 (Drummond *et al.*, 2010).

To detect possible genotyping errors (presence of null alleles), the program Micro Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) was used with 1000 bootstrap simulations at a confidence level of 95%. The deviation from Hardy Weinberg equilibrium (HWE) was estimated by the exact Raymond and Rousset test (1995a) implemented in program GENEPOP v4.2 with 1000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) interactions. The linkage disequilibrium was estimated with Fisher's probability test (Raymond and Rousset, 1995b) in GENEPOP v4.2 (Rousset, 2008) with 1000 MCMC interactions using Bonferroni

1995b) en el programa GENEPOP v4.2 (Rousset, 2008) con 1000 interacciones MCMC y empleando la corrección de Bonferroni.

De 14 loci analizados, 10 amplificaron en ambas especies. No fue posible amplificar los loci HfAAC41-A, Hau034 y Hau075. Se presentó un alto grado de polimorfismo, en promedio 15 alelos por locus en *Haemulon aurolineatum* y 21 alelos por locus en *Haemulon steindachneri* (Fig. 1). El locus

correction.

Of 14 analyzed loci, 10 amplified in both species; it was not possible to amplify the loci HfAAC41-A, Hau034 and Hau075. A high degree of polymorphism was observed: 15 alleles per locus in *H. aurolineatum* and 21 alleles per locus in *H. steindachneri*, on average (Figure 1). The HfAAC10-C locus was monomorphic in *H. steindachneri*. In *H. aurolineatum*, no loci were found that significantly

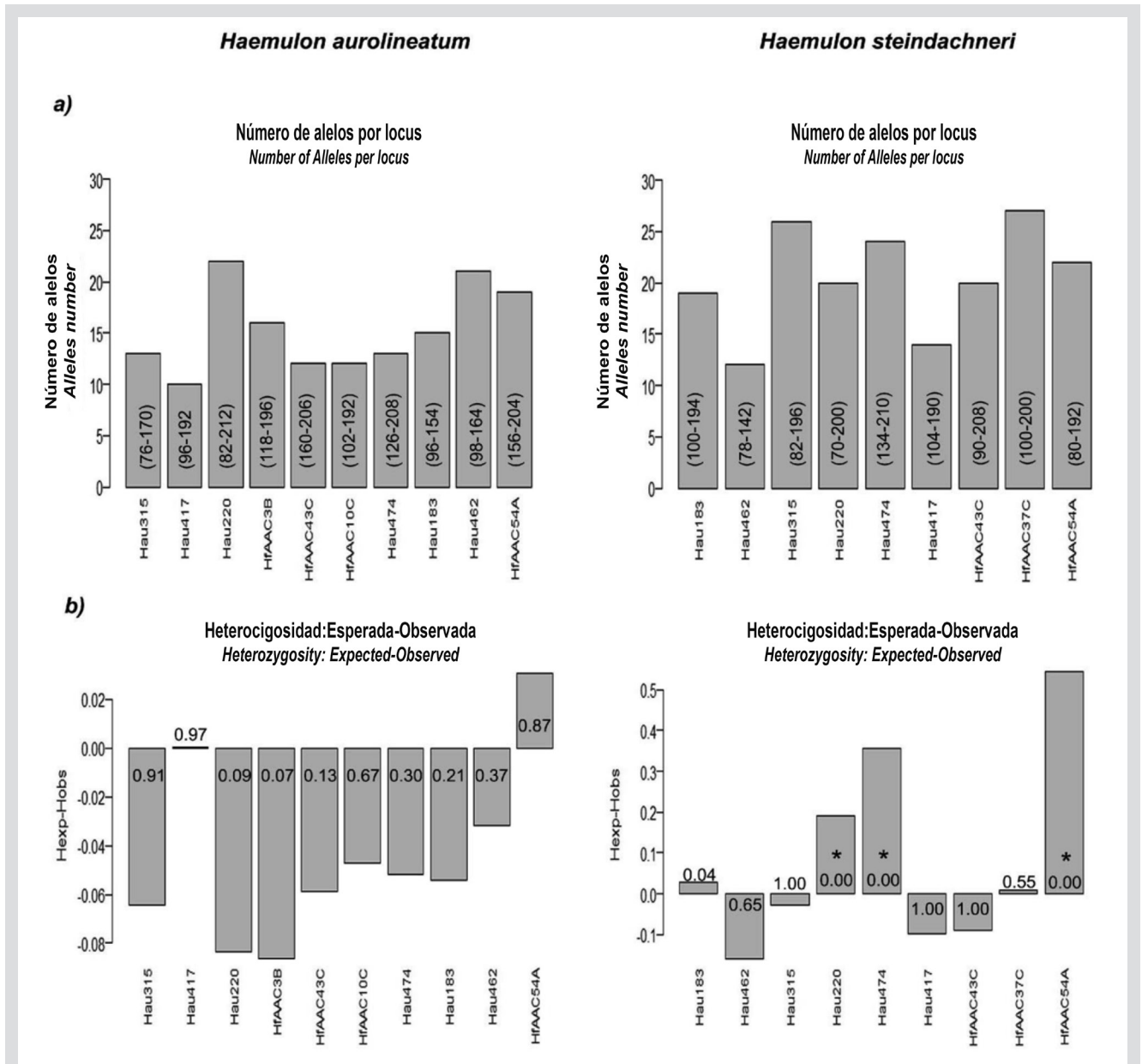


Figura 1. Resultados de amplificación cruzada en *Haemulon aurolineatum* y *Haemulon steindachneri*. a) Número de alelos por locus: Entre paréntesis en cada barra ámbito de tamaño de los alelos en pares de bases (pb). b) Heterocigosidad: Dentro de cada barra valor de p. *Denota desvío significativo del Equilibrio Hardy Weinberg después de la corrección de Bonferroni.

Figure 1. Cross-amplification results for *Haemulon aurolineatum* and *Haemulon steindachneri*. a) Number of alleles per locus: for each bar, the size of the alleles in base pairs (bp) is in parentheses. b) Heterozygosity: the p-value is within each bar. *Denotes significant deviation from Hardy Weinberg equilibrium after Bonferroni correction.

HfAAC10-C fue monomórfico en *H. steindachneri*. En *H. aurolineatum* no se hallaron loci desviados significativamente del equilibrio Hardy Weinberg, ni se evidenció presencia de alelos nulos, o tartamudeo en la genotipificación (Figura 1b). En *H. steindachneri* se encontró un desvío significativo del EHW por déficit de heterocigotos en los loci Hau220, Hau474, y HfAAC54-A, este último presentó alelos nulos (Fig. 1b). En *H. aurolineatum* se detectó desequilibrio de ligamiento entre los pares de loci Hau315 - HfAAC54-C (valor de $p = 0.000$); Hau220 - HfAAC3-B (valor de $p = 0.000$); y HfAAC10-C - Hau474 (valor de $p = 0.000$), mientras que en *H. steindachneri* no se halló desequilibrio de ligamiento (valor de $p > 0.05$).

Este estudio es el primero en probar la amplificación cruzada en la especie *Haemulon steindachneri* y aporta información para el uso de microsatélites en *H. aurolineatum*. Los microsatélites propuestos por Williams *et al.* (2004) fueron en su mayoría altamente polimórficos. Sin embargo, debido a la complejidad en el tipo de repetición del microsatélite se pueden presentar problemas de alelos nulos, como en HfAAC54 en *H. steindachneri*, aunque ese loci no presentó alelos nulos ni en *H. aurolineatum* ni en *H. flavolineatum* (Williams *et al.*, 2004).

Por lo anterior se considera que los microsatélites aislados por Williams *et al.* (2004) y por Turner *et al.* (2005) pueden ser utilizados de manera exitosa en estudios de genética de poblaciones de *Haemulon aurolineatum* y *Haemulon steindachneri*. Los microsatélites, por su alto grado de polimorfismo, son una herramienta de alta resolución para resolver preguntas de variabilidad genética en éstas especies de importancia pesquera en el Caribe colombiano.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó con la financiación de la Fundación para Promoción de la Investigación y la Tecnología-FPIT del Banco de la República de Colombia- Proyecto No. 3854, de Colciencias- Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores- Convocatoria 645 de 2014, y del Instituto de Estudios en Ciencias del Mar- CECIMAR de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Caribe (UNC). Se hace un agradecimiento especial al Laboratorio de Ictiología Marina de la Universidad del Valle y sus integrantes, por su apoyo en la estancia de investigación. Al investigador Juan David González por su apoyo en la toma de muestras y a los profesores de la UNC Néstor Campos, Sven Zea y Edna Márquez por sus sugerencias en la elaboración del proyecto. Esta publicación forma parte del trabajo de grado de la primera autora para optar por el título de Maestría en Ciencias- Línea Biología Marina de la Universidad Nacional de Colombia sede Caribe.

deviated from HWE, nor were there any null alleles or stuttering in the genotyping (Figure 1b). A significant deviation from HWE was found in *H. steindachneri* due to a deficit of heterozygotes in the loci Hau220, Hau474 and HfAAC54-A, the latter of which presented null alleles (Fig. 1b). In *H. aurolineatum*, linkage disequilibrium were detected between the loci pairs Hau315 - HfAAC54-C ($p = 0.000$), Hau220 - HfAAC3-B ($p = 0.000$) and HfAAC10-C - Hau474 ($p = 0.000$), whereas no linkage disequilibrium was found in *H. steindachneri* ($p > 0.05$).

This study is the first to test cross-amplification in *H. steindachneri*, and it provides information about the use of microsatellites in *H. aurolineatum*. The microsatellites proposed by Williams *et al.* (2004) were mostly highly polymorphic, but due to the complexity in the type of microsatellite repeats, problems related to null alleles can occur, as in HfAAC54 in *H. steindachneri*, although this locus did not present null alleles in either *H. aurolineatum* or *H. flavolineatum* (Williams *et al.* 2004).

Therefore, the microsatellites isolated by Williams *et al.* (2004) and Turner *et al.* (2005) can successfully be used in population genetics studies of *H. aurolineatum* and *H. steindachneri*. Due to their high degree of polymorphism, these microsatellites are high-resolution tools to answer questions of genetic variability in these important fishery species in the Colombian Caribbean.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was carried out with financing from the Foundation for the Promotion of Research and Technology (Fundación para Promoción de la Investigación y la Tecnología, FPIT) of the Bank of the Republic of Colombia - Project No. 3854; Colciencias - Young Researchers and Innovators Program - Call 645 of 2014; and the Institute of Studies in Marine Sciences - CECIMAR - of the National University of Colombia, Caribbean Headquarters (Universidad Nacional de Colombia, UNC). Special thanks are due to the Marine Ichthyology Laboratory of the Universidad del Valle and its members for their support during the research stay, to researcher Juan David González for his support collecting samples and to the professors of the UNC Néstor Campos, Sven Zea and Edna Márquez, for their suggestions during the development of the project. This publication is part of the work by the first author in pursuit of a Master's degree in Sciences in Marine Biology of the National University of Colombia, Caribbean Headquarters.



BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Alhjanabi, S.M. and I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.*, 25:4692-4693.
- Almanza-Bernal, M., E.J. Márquez y L. Chasqui. 2016. Evaluación de amplificación cruzada de microsatélites para estudios de genética poblacional del Cazón antillano *Rhizoprionodon porosus* (Carcharhinidae) en el Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 45(1): 41-56.
- Barbará, T., C. Palma-Silva, G.M. Paggi, F. Bered, M. F. Fay and C. Lexer. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.*, 16(18): 3759-3767.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, J. Heled and T. Thierer. 2010. Geneious v5. 5. Biomatters. Disponible en <http://www.geneious.com>
- Fresneda-Rodríguez, A, L. Chasqui y D. Alonso-Carvajal. 2013. Amplificación cruzada de microsatélites para estudios poblacionales de dos especies de camarón del género *Litopenaeus* en Colombia. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 42(1): 121-129.
- Landfnez-García, R.M., S.P. Ospina-Guerrero, D.J. Rodríguez-Castro, R. Arango y E. Márquez. 2009. Análisis genético de *Lutjanus synagris* en poblaciones del Caribe colombiano. *Cienc. Mar.*, 35(4): 321-331
- Muñoz, P., C. Quezada-Romegialli, I. Vila and D. Véliz. 2011. Cross-amplification of microsatellites from the *Atherinopsidae* *Odontesthes perugiae* and *Odontesthes argentinensis* to Chilean silversides of the genus *Odontesthes* and *Basilichthys*. *Gayana*, 75(2): 182-186
- Purcell, J. F., R. K. Cowen, C. R. Hughes and D. A. Williams. 2006. Weak genetic structure indicates strong dispersal limits: a tale of two coral reef fish. *Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci.*, 273: 1483-1490.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49(6): 1280-1283.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995b. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Her.*, 86(3): 248-249.
- Rico, C., I. Rico and G. Hewitt. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci.*, 263: 549-557.
- Rocha, L. A., K. C. Lindeman, C. R. Rocha and H. A. Lessios. 2008. Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae). *Mol. Phyl. Evol.*, 48(3): 918-928.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.*, 8: 103-106.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.*, 18(2): 233-234.
- Selkoe, K. A. and R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.*, 9(5): 615-629.
- Tavera, J.J., A. Acero P., E.F. Balart and G. Bernardi. 2012. Molecular phylogeny of grunts (Teleostei, Haemulidae), with an emphasis on the ecology, evolution, and speciation history of New World species. *BMC Evol. Biol.*, 12(1): 57.
- Tavera, J.J., A. Acero P. and P. Wainwright. 2018. Multilocus phylogeny, divergence times, and a major role for the benthic-to-pelagic axis in the diversification of grunts. *Mol. Phyl. Evol.*, 121: 212-223.
- Turner, N.K., R.W. Chapman and A.O. Ball. 2005. Population structure of the tomtate, *Haemulon aurolineatum*, No publicado. GenBank: AY523674.1, AY523675.1, AY523677.1, AY523679.1, AY523680.1, AY523681.1, AY523682. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/46811207>. 26/04/2017
- Van Oosterhout, C., W. Hutchinson, D. Willis and P. Shipley. 2004. Micro Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, 4:535-538.
- Williams, D.A., J. Purcell, R.K. Cowen and C.R. Hughes. 2004. Microsatellite multiplexes for high-throughput genotyping of French grunts (*Haemulon flavolineatum*, Pisces: Haemulidae) and their utility in other grunt species. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 46-48.

RECIBIDO / RECEIVED: 24/04/2017

APROBADO / APPROVED: 02/04/2018