

UCH-FC  
MAG-B  
8586d  
C.1

**Departamento de Ciencias Ecológicas**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de Chile**



***Inferencia cronológica de la distribución antitropical en peces del  
Pacífico-Este mediante el uso de dos marcadores moleculares  
mitocondriales.***

**Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva**

**Facultad De Ciencias**

**Andrea Ximena Silva Báez**

**Noviembre, 2007**

**Director de Tesis Dr.:**

**Elie Poulin**

**Co-Director de Tesis Dr.:**

**Marco Méndez**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**ANDREA XIMENA SILVA BÁEZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de noviembre del año 2007.

**Director de Tesis:**

**Dr. Elie Poulin**

**Co-Director de Tesis:**

**Dr. Marco Méndez**

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dra. Irma Villa**

**Dr. Eduardo Palma**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Para mi Consuelo...**

## RESUMEN BIBIOGRAFICO



Andrea Silva Báez nació en Santiago, el 7 de Diciembre 1976. Se graduó de enseñanza media en 1994, en el Liceo San José de La Calera. Ingresó a la Pontificia Universidad Católica de Chile en 1995, donde obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas en 1999 y Título Profesional de Biólogo, Mención Recursos Naturales y Medio Ambiente el año 2000. En 2004 ingresó al Programa de Magíster en Ciencias Biológicas, Mención Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile, actualmente cursa en la Universidad Austral de Chile el Programa de Doctorado en Ciencias, Mención Sistemática y Ecología.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor, Elie Poulin, por su invaluable ayuda, conocimientos y muy especialmente por su inagotable paciencia. También agradezco a mi co-tutor, Marco Méndez, por su gran apoyo y buena disposición para responder todas mis inquietudes. A mis evaluadores Dra. Irma Villa y Dr. Eduardo Palma, por su gran aporte a la finalización exitosa de esta tesis. A mis amigos y compañeros de laboratorio, Angie, Pamela, David, Juan Carlos, Marcela Vidal y Marcela Espinoza, por compartir discusiones y el trabajo conmigo y hacer de mi estadía en el LEM siempre alegre y amena.

A mis amigos y profesores de la Universidad Austral, Christian, Marco, Lenny, Roger, Mely, Juan Pablo, Paulina, y Pablito por su apoyo y amistad, también a Rodrigo Vega por compartir sus conocimientos conmigo.

Quiero además agradecer a mis padres, por su cariño, apoyo, comprensión, y especialmente por todos sus esfuerzos para que yo realizara mis sueños.

A mi hermana, que siempre me enseñó con su ejemplo a ser perseverante y a no rendirse, además de darme su compañía en momentos difíciles.

A Roberto por su apoyo, paciencia y ternura.

A Antonia por recargar mi hogar en cada una de sus visitas, con sus sonrisas.

Finalmente quiero agradecer a mi niña, Consuelo, por ser mi más fiel compañera y mi mayor alegría durante sus casi 8 añitos de vida.

## INDICE DE MATERIAS

	Página
Índice de materias .....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de tablas .....	xiii
Abreviaturas .....	xv
1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	4
2.1 Género <i>Trachurus</i> .....	9
2.2 Género <i>Engraulis</i> .....	11
2.3 Género <i>Sardinops</i> .....	14
2.4 Hipótesis .....	19
2.5 Objetivos	
2.5.1 Objetivo general .....	19
2.5.2 Objetivos específicos .....	19
3. Materiales y Métodos	
3.1 Obtención de muestras .....	21
3.2 Amplificaciones	
3.2.1 RC <i>Trachurus</i> .....	23
3.2.2 Cyt b <i>Trachurus</i> .....	23
3.2.3 RC <i>Engraulis</i> .....	23
3.2.4 Cyt b <i>Engraulis</i> .....	23
3.2.5 RC <i>Sardinops</i> .....	24

3.2.6 Cyt b <i>Sardinops</i> .....	24
3.3 Análisis de secuencias .....	26
3.4 Análisis filogenéticos .....	27
3.5 Estimación de tiempos de divergencia	
3.5.1 Por coalescencia .....	28
3.5.2 Por reconstrucción filogenética .....	29
3.5.3 Tasas mutacionales empleadas .....	29
<b>4. Resultados</b>	
4.1 <i>Trachurus</i>	
4.1.1 Variación secuencias RC .....	30
4.1.2 Variación secuencias Cyt b .....	30
4.2 <i>Engraulis</i>	
4.2.1 Variación secuencias RC .....	31
4.2.2 Variación secuencias Cyt b .....	32
4.3 <i>Sardinops</i>	
4.3.1 Variación secuencias RC .....	33
4.3.2 Variación secuencias Cyt b .....	34
4.4 Análisis filogenético	
4.4.1 Género <i>Trachurus</i>	
4.4.1.1 RC .....	36
4.4.1.2 Cyt b .....	37
4.4.2 Género <i>Engraulis</i>	
4.4.2.1 RC .....	37

4.4.1.2 Cyt b	.....	38
4.4.3 Género <i>Sardinops</i>		
4.4.1.1 RC	.....	39
4.4.1.2 Cyt b	.....	40
4.5 Estimación tiempos de divergencia	.....	40
5. Discusión	.....	42
6. Conclusiones	.....	52
7. Bibliografía	.....	78
Anexos	.....	89



## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	54
Distribución geográfica del Género <i>Trachurus</i> .	
<b>Figura 2</b>	54
Cladograma de las relaciones filogenéticas entre 11 especies del género <i>Trachurus</i> .	
<b>Figura 3</b>	55
Distribución geográfica del género <i>Engraulis</i>	
<b>Figura 4</b>	55
Cladograma de las relaciones filogenéticas entre especies del género <i>Engraulis</i>	
<b>Figura 5</b>	56
Distribución geográfica del género <i>Sardinops</i>	
<b>Figura 6</b>	56
Cladograma de las relaciones filogenéticas entre especies de los géneros <i>Sardina</i> – <i>Sardinops</i> .	

<b>Figura 7</b>	57
Network filogenético por median-joining de haplotipos de la RC de <i>T. murphyi</i> y <i>T. symmetricus</i> .	
<b>Figura 8</b>	58
Network filogenético por median-joining de haplotipos de Cyt b de <i>T. murphyi</i> y <i>T. symmetricus</i> .	
<b>Figura 9</b>	59
Network filogenético por median-joining de haplotipos de la RC de <i>E. ringens</i> y <i>E. mordax</i> .	
<b>Figura 10</b>	60
Network filogenético por median-joining de haplotipos Cyt b de <i>E. ringens</i> y <i>E. mordax</i> .	
<b>Figura 11</b>	61
Network filogenético por median-joining de haplotipos de la RC de <i>S. sagax</i> y <i>S. caeruleus</i> .	

<b>Figura 12</b>	62
Network filogenético por median-joining de haplotipos de Cyt b de <i>S. sagax</i> y <i>S. caeruleus</i> .	
<b>Figura 13</b>	63
Representación de las distancias entre haplotipos de la RC de los tres pares de especies estudiadas mediante NJ.	
<b>Figura 14</b>	64
Representación de las distancias entre haplotipos de Cyt b de los tres pares de especies estudiadas mediante NJ.	
<b>Figura 15</b>	65
Árbol filogenético obtenido por MP de las secuencias de RC del género <i>Trachurus</i> .	
<b>Figura 16</b>	66
Árbol filogenético obtenido por ML de las secuencias de RC del género <i>Trachurus</i> .	
<b>Figura 17</b>	67
Árbol filogenético obtenido por MP de las secuencias de Cyt b del género <i>Trachurus</i> .	

<b>Figura 18</b>	68
Árbol filogenético obtenido por ML de las secuencias de Cyt b del género <i>Trachurus</i> .	
<b>Figura 19</b>	69
Árbol filogenético obtenido por MP de las secuencias de RC del género <i>Engraulis</i> .	
<b>Figura 20</b>	70
Árbol filogenético obtenido por ML de las secuencias de RC del género <i>Engraulis</i> .	
<b>Figura 21</b>	71
Árbol filogenético obtenido por MP de las secuencias de Cyt b del género <i>Engraulis</i> .	
<b>Figura 22</b>	72
Árbol filogenético obtenido por ML de las secuencias de Cyt b del género <i>Engraulis</i> .	

<b>Figura 23</b>	73
Árbol filogenético obtenido por MP de las secuencias de RC del género <i>Sardinops</i> .	
<b>Figura 24</b>	74
Árbol filogenético obtenido por ML de las secuencias de RC del género <i>Sardinops</i> .	
<b>Figura 25</b>	75
Árbol filogenético obtenido por MP de las secuencias de Cyt b del género <i>Sardinops</i> .	
<b>Figura 26</b>	76
Árbol filogenético obtenido por ML de las secuencias de Cyt b del género <i>Sardinops</i> .	
<b>Figura 27</b>	77
Modelos de evolución <i>Trachurus murphyi</i> - <i>Trachurus symmetricus</i> , <i>Engraulis ringens</i> - <i>Engraulis mordax</i> y <i>Sardinops sagax</i> - <i>Sardinops caeruleus</i> .	

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1</b>	22
Número de muestras total recolectadas, se muestra el detalle por género especie y localidad.	
<b>Tabla 2</b>	25
Condiciones para la amplificación por PCR de la RC y Cyt b de las especies <i>T. murphyi</i> y <i>T. symmetricus</i> .	
<b>Tabla 3</b>	25
Condiciones optimizadas para la amplificación por PCR de la RC y Cyt b de las especies <i>E. ringens</i> y <i>E. mordax</i> .	
<b>Tabla 4</b>	26
Condiciones optimizadas para la amplificación por PCR de la RC y Cyt b de las especies <i>S. sagax</i> y <i>S. caeruleus</i> .	
<b>Tabla 5</b>	35
Índices de diversidad genética obtenidos para RC de mtDNA en <i>T. murphyi</i> , <i>T. symmetricus</i> , <i>E. ringens</i> , <i>E. mordax</i> , <i>S. sagax</i> , <i>S. caeruleus</i> .	

<b>Tabla 6</b>	35
Índices de diversidad genética obtenidos para Cyt b de mtDNA en <i>T. murphyi</i> , <i>T. symmetricus</i> , <i>E. ringens</i> , <i>E. mordax</i> , <i>S. sagax</i> , <i>S. caeruleus</i> .	
<b>Tabla 7</b>	41
Distancias genéticas expresadas en tiempo mutacional para <i>T. murphyi</i> - <i>T. symmetricus</i> , <i>E. ringens</i> - <i>E. mordax</i> , <i>S. sagax</i> - <i>S. caeruleus</i> .	
<b>Tabla 8</b>	43
Estimación de las fechas de divergencia para las especies hermanas del Pacífico-Este de los géneros <i>Trachurus</i> ( <i>T. murphyi</i> - <i>T. symmetricus</i> ), <i>Engraulis</i> ( <i>E. ringens</i> - <i>E. mordax</i> ) y <i>Sardinops</i> ( <i>S. sagax</i> - <i>S. caeruleus</i> ).	

## ABREVIATURAS

NADW	corriente Nor-Atlántica de aguas profundas
TSM	temperatura superficial del mar
mtDNA	DNA mitocondrial
RC	Región Control
Cyt b	Citocromo b
MYA	Millones de años atrás
D	Distancia genética de Nei's
K	Número de haplotipos
h	Diversidad haplotípica
S	Número de sitios polimórficos
$\Pi$	Número promedio de diferencias entre pares de secuencias
$\Pi$ inter	Número promedio de diferencias entre pares de secuencias de distinta especie
$\pi$	Diversidad nucleotídica
Fst	Índice de diferenciación genética
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MP	Máxima parsimonia
MP	Máxima Verosimilitud
NJ	Algoritmo de agrupamiento del Vecino más cercano
AIC	Criterio de información de Akaike
LRT	Likelihood Ratio Test



## 1.- RESUMEN

La presencia de taxa hermanos en zonas templadas y su ausencia en el ecuador es una característica común de muchos organismos terrestres y acuáticos. Sin embargo, los factores causales de esta antitropicalidad y la fecha de su ocurrencia son motivo de intensos debates. Una manera de abordar este problema es mediante la estimación de los tiempos de divergencia entre especies hermanas que presentan dicha distribución y analizar su coincidencia con hitos biogeográficos conocidos. Para el caso de los peces marinos, la distribución antitropical es un fenómeno típico de las costas chilenas y californianas, especialmente para júreles (*Trachurus murphyi*, *Trachurus symmetricus*), anchovetas (*Engraulis ringens*, *Engraulis mordax*) y sardinias (*Sardinops sagax*, *Sardinops caeruleus*). En base a estimaciones de distancia genéticas por coalescencia, construcción de árboles filogenéticos entre dichas especies y utilizando dos marcadores moleculares mitocondriales (región control y citocromo b) pudimos observar que las especies del género *Trachurus* y *Sardinops* presentan distancias genéticas similares: 2.1 a 2.4 % de divergencia para región control y 0.9 a 0.5 % de divergencia para citocromo b, resultados que reflejarían una separación de hace aproximadamente 0.4 a 0.1 millones de años (tasas de 3,6% para región control y 1-2 % para citocromo b). Por otra parte las especies hermanas *E. ringens* y *E. mordax* presentan distancias genéticas mucho mayores (16.9 - 14.8 % de divergencia), aplicando las mismas tasas de reloj molecular las distancias obtenidas reflejan una separación hace 3.8 a 2.4 millones de años, de acuerdo a la región control y 21 - 3.7 millón de años considerando citocromo b. Los resultados apuntan a divergencias para las especies de los géneros *Trachurus* y

*Sardinops* durante el Pleistoceno y para las especies del género *Engraulis* durante el Mioceno-Plioceno.

Se encontró además, que las especies de un mismo género muestran una historia demográfica similar en los dos Hemisferios, lo que refleja que, frente a cambios oceanográficos de gran escala, especies hermanas estarían respondiendo de manera similar. Por otra parte los datos de diversidad genética, obtenidos a nivel de especies, reflejan similares modelos de evolución para las especies de los géneros *Trachurus* y *Engraulis*, pasando durante su historia por “cuellos de botella” que redujeron sus diversidades genéticas. Las especies del género *Sardinops* muestran poblaciones estables que reflejan un crecimiento poblacional inmediatamente después de la escisión del nodo que une los linajes de las dos especies hermanas.

The presence of sibling taxa in temperate zones and its absence in the equator is a common characteristic of many terrestrial and aquatic organisms. However, the causal factors of this antitropicality, and the date of their occurrence are the subject of intense debate. One way to address this problem is by estimating the divergence time among sister species that exhibit this distribution, and to analyze its coincidence using known geographic landmarks. For the case of marine fishes, the antitropical distribution is a typical phenomenon of the Chilean and Californian coasts, especially for jurel (*Trachurus murphyi*, *Trachurus symmetricus*), anchoveta (*Engraulis ringens*, *Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*, *Sardinops caeruleus*). Based on coalescent estimates of genetic distance, re-construction of phylogenetic trees among these species and using two mitochondrial markers (control region and cytochrome b) I found that the species of the genus *Trachurus* and *Sardinops* present

similar genetic distances: 2.1 to 2.4% of divergence for control region and 0.9 to 0.5% of divergence for cytochrome b, results that would reflect a separation of approximately 0.4 to 0.1 million years (clock calibration of 3,6% for control region and 1-2% for cytochrome b). On the other hand, the sister species *E. ringens* and *E. mordax*, showed much larger genetic distances (16.9 - 14.8 % of divergence). Applying the same rates of molecular clock, the obtained distances suggested a separation ranging from 3.8 to 2.4 million years according to the control region, and 21 - 3.7 million years according to cytochrome b. These results suggest that for the species of the genus *Trachurus* and *Sardinops* divergence occurred during Pleistocene, and for the species of the genus *Engraulis* divergence occurred during Miocene-Pliocene.

I also found that the species of the same genus showed a similar demographic history in the two hemispheres, what reflects that when facing great oceanographic changes, sister species would respond in a similar fashion. On the other hand, the obtained data of genetic diversity at the species level, reflect similar evolution models for *Trachurus* and *Engraulis*, which passed through bottlenecks that reduced their genetic diversities. The species of the genus *Sardinops*, however, exhibited stable populations that reflect a population growth immediately after the division of the node that unites the lineages of the two species sisters.

## 2.- INTRODUCCION

La distribución de especies a nivel global es una consecuencia de procesos biogeográficos históricos que pueden reconstruirse en base a las características actuales de estos organismos (Brown & Lomolino, 1998). En general, la mayoría de las especies animales y vegetales se distribuyen continuamente en un gradiente latitudinal, presentando un recambio hacia los polos (Brown & Lomolino, 1998). Sin embargo, existen taxa que están representados en ambos hemisferios por especies hermanas, estando ausentes en los trópicos. Este patrón de distribución ha sido descrito con diversos términos (“amphitropical” Cox, 1990; “bipolar” Ekman, 1953; “antiecuatorial” Randall, 1981), entre los cuales el de “antitropical”, es el más aceptado (Hubbs, 1952; Bowen & Grant, 1997; Burridge, 2002). Los mecanismos propuestos como generadores de distribuciones antitropicales se pueden dividir en dos categorías: (1) dispersión y (2) vicarianza. La *dispersión* se refiere al proceso mediante el cual una especie ancestral distribuida originalmente en uno de los trópicos, amplía su rango de distribución hacia el otro trópico sin permanecer en la zona del ecuador (Ekman, 1953; Lindberg, 1991). La *vicarianza*, por otro lado se refiere al proceso mediante el cual una especie ancestral que presentaba originalmente una distribución continua, interrumpe su distribución generando dos especies hermanas al norte y sur de los trópicos (Valentine, 1984, Nelson, 1985, Crame, 1993).

Para explicar el origen y cronología de la distribución antitropical de las especies del Pacífico-Este, principalmente se han planteado dos hipótesis (Hilbish y col., 2000): (1) Hipótesis del Pacífico-Plioceno e (2) Hipótesis del Pacífico-

Pleistoceno. La *hipótesis del Pacífico-Plioceno*, dice que el origen de la antitropicalidad se relaciona con la emergencia del istmo de Panamá y el cierre de la conexión Atlántico-Pacífico, por lo que su origen se remontaría hace 3.5 millones de años (MA). (2) La *hipótesis del Pacífico-Pleistoceno* dice que la divergencia transecuatorial tiene un origen más reciente y está relacionada con el comienzo de los ciclos glaciales e interglaciales (Hilbish y col., 2000; Lindberg, 1991).

Es reconocido que el cierre de la conexión entre el Pacífico y el Atlántico trajo grandes cambios en la circulación Oceánica, en la salinidad y nivel de agua de estos océanos, pero ¿cuando ocurrieron estos cambios? y ¿cuáles son las consecuencias de estos? son preguntas que aun generan controversia (Haug & Tiedemann, 1998; Haug, 2004).

Estudios con registros paleo-oceanográficos, indican que el cierre de la conexión entre océanos fue gradual y abarco desde 13 - 2.7 millones de años atrás (MYA), produciendo una marcada reorganización en la circulación oceánica desde hace 4.6 MY (Haug & Tiedemann, 1998). Se han detectado cambios significativos en los ensambles de foraminíferos planctónicos desde hace 6.8, 4.6, 2.5 y 1.9 MYA (Keller y col., 1989; Haug & Tiedemann, 1998). Fósiles de especies pelágicas, encontrados a ambos lados del istmo, muestran que el cierre fue completo para estas especies hace 3.6 MYA, pero el cierre que permitió el intercambio de fauna terrestre entre América Norte y Sur fue hace 2.7 MY.

La convergencia de placas de Norte América, Caribe y Sur América con la gradual emergencia del Istmo de Panamá produjo la disminución en el intercambio de agua entre los dos océanos, Keller y col., en 1989 y posteriormente Haug y col., en el 2001 registraron  $\delta^{18}\text{O}$  en foraminíferos planctónicos y epibentónicos

respectivamente, recobrados en testigos del Pacífico y Mar Caribe, observando que entre los 4.7 y 4.2 MA los cálculos de  $\Delta\delta^{18}\text{O}$  comienzan a indicar diferencias en la salinidad entre el Pacífico y Atlántico de aproximadamente 1‰ (mayor salinidad en el Atlántico) y/o 2.5°C más de temperatura en el Pacífico que el Atlántico, lo que produjo cambios en la circulación superficial y profunda tales como la intensificación de la “*Corriente del Golfo*” (Gulf Stream) (Haug y col., 2001, Haug, 2004), se produjo la fase final de la formación de la corriente Nor-Atlántica de aguas profundas (NADW) (Haug & Tiedemann, 1998), corriente desarrollada durante el Mioceno-medio (Wright & Miller, 1996) y como consecuencia de estos cambios se produce la intensificación de la circulación termohalina actual (*The Global Ocean Conveyor*) (Haug, 2004). Estos cambios habrían sido un factor clave para impulsar condiciones climáticas calidas, el llamado período cálido del Plioceno, entre 4.7 y 3.1 MY (Budyko y col., 1985) y posteriormente gatillar la glaciación en el hemisferio norte, ocurrida hace 2.7 MY (Haug y col., 2005).

Alguno o varios de los cambios producidos por la emergencia del istmo de Panamá pudieron ser la causa de la distribución antitropical observada en especies marinas. Cambios en las temperaturas del Pacífico-este, principalmente un aumento de éstas, pudo haber afectado los rangos de distribución de especies marinas adaptadas a condiciones menos cálidas y producir especiación disruptiva que llevó a la posterior formación de especies hermanas por mecanismo de vicarianza.

Registros de la temperatura superficial del mar (TSM) durante el último máximo glacial, entre 19.000 y 16.000 años en la región del Pacífico central (Blard y col., 2007), muestran que la temperatura en el Océano Pacífico disminuyó aproximadamente 4,00°C en la zona ecuatorial (CLIMAP, 1976, 1981), esta baja de

la temperatura, así como las producidas en períodos glaciales anteriores, pudo romper barreras de aislamiento reproductivo para poblaciones que están en camino de especiación, adaptadas a condiciones frías, favoreciendo flujo génico entre estas. Si este flujo génico ocurrió, el origen de la distribución antitropical en especies marinas sería más reciente que el propuesto por un origen debido a la emergencia del istmo de Panamá y el mecanismo involucrado sería dispersión.

Las dos hipótesis sobre el origen y cronología de la antitropicalidad se enmarcan en épocas geológicas distintas, por tanto las estimaciones de tiempo de divergencia entre especies de un género de distribución antitropical, permiten dilucidar la historia del mismo y poner a prueba estas distintas hipótesis biogeográficas (BurrIDGE, 2002). Un buen método para estimar tiempos de divergencia entre especies es utilizar marcadores moleculares que nos permitan inferir la evolución de las secuencias, ahondando en el nivel genealógico (Sunnucks, 2000) de las mismas. En este aspecto resulta esencial escoger el marcador molecular apropiado, para que la resolución entregada por estos esté en el nivel jerárquico esperado. Los marcadores moleculares mitocondriales nos permiten obtener información sobre la historia de procesos biogeográficos de las poblaciones, esto debido a dos importantes características del DNA mitocondrial: no recombina y es de herencia mayoritariamente materna. La región control (RC) del DNA mitocondrial (mtDNA) es una zona que no codifica para proteínas, por lo que es la región más variable dentro del mtDNA. Producto de su gran variabilidad, esta zona ha sido ampliamente utilizada en peces para estudios genéticos a nivel intra-específico (Avisé, 1985; Hauser & Ward, 1998, Billington, 2002, Shaklee & Currens, 2002), este marcador molecular es actualmente considerado como uno de los más

apropiados para la identificación de poblaciones diferenciadas (o stocks genéticos) dentro del rango de distribución de una especie (Féral, 2002). Entre los genes que codifican proteínas del mtDNA, el Cyt *b* es el más usado para evaluar relaciones filogenéticas entre diferentes taxa (Meyer y col., 1990) y presenta tasas de sustitución menores a las de la RC.

La evidencia ecofisiológica muestra que los peces marinos de zonas templadas son intolerantes a las condiciones cálidas de las aguas tropicales, por lo que el océano constituye una importante barrera geográfica para la dispersión de estas especies entre el hemisferio norte y sur (Bowen & Grant, 1997). Por esta razón, los peces marinos presentan numerosos ejemplos de especies en que se observa distribución antitropical (Hubbs, 1952; Hubbs y col., 1953, Collette & Smith, 1981; Randall, 1981) y constituyen un buen modelo para poner a prueba hipótesis acerca del origen y mecanismo de generación de esta antitropicalidad. Entre los peces marinos que presentan distribución antitropical se encuentran las especies del género *Trachurus* (orden *Perciformes*), género *Engraulis* (orden *Clupeiformes*) y género *Sardinops* (orden *Clupeiformes*). Por sus características generales demográficas y de historia de vida (cardúmenes densos, altas fluctuaciones poblacionales, tiempos generacionales cortos, y alta mortalidad), estas especies han sido agrupadas con el título de “pequeños peces pelágicos” (Lluch-Belda y col. 1989, 1992; Kawasaki 1991, FAO 2001). La antitropicalidad de estas especies está representada en el Pacífico sur-oriental (costas chilenas) y el Pacífico nor-oriental (costas californianas). Para el caso del género *Trachurus*, comúnmente conocidos como júreles, en las costas chilenas se encuentra *T. murphyi* (Nichols, 1920), y en las



costas californianas *T. symmetricus* (Ayres, 1855). El género *Engraulis*, comúnmente conocido como anchovetas, está representada en las costas chilenas por *E. ringens* (Jenyns, 1842) y en las costas californianas por *E. mordax* (Girard, 1854). Por último, el género *Sardinops*, conocido comúnmente como sardinas, presenta a *S. sagax* (Jenyns, 1842) en las costas chilenas y *S. caeruleus* (Girard, 1854) en las costas californianas.

## 2.1 Género *Trachurus*

El género *Trachurus* pertenece a la familia *Carangidae*, orden *Perciformes*. Se distribuye entre los 10 y 400 m de profundidad, se alimenta de Zooplancton, principalmente eufáusidos (Medina & Arancibia, 1992, Alegría, FIP 93-17), vive en total 16 años aproximadamente, alcanzando su madurez sexual alrededor de los 2 – 3 años de edad, 21.6 cm. de longitud (Serra, 1991, Alegría, FIP 93-17). Posee una amplia distribución, incluyendo especies que habitan costas y aguas oceánicas templadas, subtropicales y tropicales (Eschemeyer, 2003). La mas reciente revisión del género incluye a 14 especies (Nekrasov, 1994): *T. alevi*, *T. capensis*, *T. declives*, *T. delagoa*, *T. indicus*, *T. japonicus*, *T. lathami*, *T. mediterraneus*, *T. murphyi*, *T. novaezelandiae*, *T. picturatus*, *T. symmetricus*, *T. trachurus*, *T. trecae*. Posteriormente Eschemeyer (2003) introdujo en el género a *T. longimanus*, aunque el autor reconoce que el estatus de esta especie en el género es cuestionable debido a que podría ser considerada sinónimo de *T. picturatus*. La figura 1 muestra la distribución de 11 especies pertenecientes al género *Trachurus*, reflejando la distribución antitropical de los taxa *T. murphyi* y *T. symmetricus* (Cárdenas y col. 2005).

El trabajo más reciente para dilucidar las relaciones filogenéticas en el género es el de Cárdenas y col. (2005), quienes estudiaron secuencias de Citocromo b (Cyt b) y región control (RC), usando una tasa de divergencia de 1% estimaron el origen del género hace 2.6 MYA, habiendo ocurrido la divergencia entre *T. murphyi* y *T. symmetricus* hace 0.4 MYA. Los mismos autores calcularon nuevamente las fechas de divergencias pero con tasas más conservativas (0,13% a 0,15%), estimadas a partir de calibración fósil (véase Danil'Chenko, 1964; Landini y col., 2002). Así, la fecha estimada de origen del género aumentaría a 16,7 - 20,1 MYA y la divergencia entre *T. murphyi* y *T. symmetricus* a 2.7 -3.3 MYA. Las relaciones filogenéticas de 11 especies del género *Trachurus* se muestran en la figura 2.

## 2.2 Género *Engraulis*

Las especies del género *Engraulis*, familia *Engraulidae*, orden *Clupeiformes*, habitan entre los 0 y 300 m. de profundidad y viven entre 3 y 7 años dependiendo de la especie (Whitehead, 1988), alcanzando su madurez sexual a los 12 cm., entre el año y año y medio (Chiappa, 1989; Cubillos, 1999; Cubillos, 1998, FIP 96-10). Un estudio del régimen alimentario de *Engraulis mordax* mostró que estas pasan de ser un consumidor primario (alimento principal: diatomeas, dinoflagelados, radiolarios y huevesillos) durante las primeras etapas de su desarrollo (edades "0" a "I" años,) a un consumidor secundario (edades de "II" "VII" años) alimentándose principalmente de zooplancton (Chiappa, 1989).

Nelson (1983, 1984, 1985), y Whitehead y col. (1988), reconocen ocho especies como parte del género *Engraulis*: *E. mordax* (Pacífico Nor Este), *E. ringens* (Pacífico Sur Este), *E. anchoita* (Pacífico Sur Oeste) *E. ecrasicolus* (Europa y Norte de África), *E. capensis* (Namibia y Sud África), *E. japonicus* (Japón-Taiwán), *E. australis* (Australia y Nueva Zelanda) y en base a su morfología y distribución las dividen en dos grupos: un taxón del "Nuevo Mundo" que incluye las especies *E. ringens*, *E. mordax*, *E. anchoita*. El segundo grupo corresponde a las especies del "Viejo Mundo", incluyendo el Pacífico Oeste y contempla a las otras cinco especies, *E. japonicus*, *E. australis*, *E. ecrasicolus*, *E. capensis* y *E. eurystole*. La figura tres muestra la distribución del género. Grant y col. (2005) examinaron en siete de las ocho especies mencionadas (ausente en el análisis *E. eurystole*) los productos de 34 loci de enzima codificantes y la amplificación de una región del Cyt b (521pb). Ambos set de datos mostraron una profunda separación entre las anchovetas del Nuevo y Viejo Mundo, revelando valores de divergencia típicos de géneros distintos

(Thorpe, 1982). Para los datos de aloenzimas estos autores encontraron un promedio de distancia genética  $D = 1.26 \pm 0,27$  entre las especies del Nuevo y Viejo Mundo, la distancia más pequeña encontrada entre estos dos grupos de especies fue entre *E. australis* y *E. mordax* ( $D = 0,852 \pm 0,196$ ) y luego entre *E japonicus* y *E mordax* ( $D = 0,911 \pm 0,208$ ).

Para las secuencias de Citocromo b las distancias de divergencias neta fueron  $d_{\text{net}} = 15\%$  entre especies de Nuevo y Viejo Mundo La divergencia neta encontrada, entre *E. mordax* y las especies del Viejo mundo es del rango  $d = 0,157 - 0,173$ . Así, datos de aloenzimas y Cyt b identifican a *E. mordax* como el taxa hermano al clado de *Engraulis* del Viejo Mundo, estimando que esta separación ocurrió dentro de los últimos 10 millones de años. Para estimar fechas de divergencia los autores aplicaron la hipótesis del reloj molecular, con la tasa de calibración  $D = 0.052$  por MA (Vawter y col. 1980) para aloenzimas y 2% de divergencia por millón de años para Cyt b (Grant & Bowen, 1998; Bowen y col., 2001). En las especies del Nuevo Mundo, con los datos aloenzimáticos, encontraron que *E. anchoita* y *E. ringens* son taxa hermanos presentando una distancia  $D = 0.703$ , el taxa hermano a este grupo es *E. mordax* que presenta distancias  $D = 0.85$  con *E. ringens* y  $D = 1,05$  con *E. anchoita*. Con estos datos, la estimación de los autores para la edad de divergencia entre *E. mordax* y *E. ringens* – *E. anchoita* es hace 15 – 23 MA. La divergencia neta encontrada, con secuencias de Cyt b, entre *E. anchoita* - *E. ringens* es  $d_{\text{net}} = 0.066$ , entre *E. mordax* - *E. anchoita* es  $d_{\text{net}} = 0.211$  y entre *E. mordax* - *E. ringens* es  $d_{\text{net}} = 0.215$ . Calibrando los nodos en las filogenias los autores estimaron que la separación de *E. mordax* a las otras dos especies de Sud-América fue hace 10.7 MA. De acuerdo a los autores de este trabajo (Grant y col. 2005), el aislamiento Norte – Sur de las

especies del Pacífico Este, pudo ocurrir producto de cambios en los patrones climáticos y de circulación oceánica, ocurridos hace 7 – 10 MA, en este momento se formó la corriente Nor Atlántica de aguas profundas (NADW), que influenció los patrones de circulación global. La separación entre *E. ringens* y *E. anchoita* ocurrió más recientemente y puede ser asociada con el enfriamiento global de mediados del Plioceno (Mercer, 1976). Las relaciones filogenéticas de siete especies del género *Engraulis* muestran que *E. mordax* sería una especie hermana con el ancestro de *E. ringens* y *E. anchoita*, es decir el ancestro común para estas dos especies sufrió una escisión posterior a la divergencia con *E. mordax* (Grant y col. 2005, Fig. 4).

### 2.3 Género *Sardinops*

El género *Sardinops* pertenece a la familia *Clupeidae*, orden *Clupeiformes*. Está constituido por un grupo de especies o sub-especies epipelágicas (0 a 200 mt. de profundidad) que viven alrededor de 10 a 12 años de edad y alcanzan la madurez sexual a los 21 cm. (Subsecretaría de pesca, 2006), aproximadamente al año de edad (Blackburn, 1950). Estudios pesqueros han revelado que la dieta de las sardinas consiste principalmente en fitoplancton (en especial diatomeas), y en menor medida en copépodos y dinoflagelados (Wong, 1971; IFOP).

El origen del género *Sardinops* proviene de la diversificación del ancestro común para los géneros *Sardina* – *Sardinops*. Existen principalmente dos hipótesis respecto al origen y edad de la divergencia de estos géneros: en el Mioceno medio, relacionado con el cierre del mar de Thetis hace 18 MA (Steininger y col., 1985; Berggren & Hollister, 1977), y un origen más reciente, en el Plioceno medio, postulado por Okazaki (Okazaki y col. 1996), el cual dice que la emergencia del Istmo de Panamá hace aproximadamente 3 MA habría sido la causante de la escisión del ancestro común de estos géneros. Mediante un estudio de variabilidad aloenzimática, Grant & Leslie (1996) estimaron dicha diversificación utilizando la variabilidad de 34 loci de proteínas codificantes, estos autores reportaron un valor de  $D = 1.04$  (distancia genética de Nei's) entre *Sardinops* y *Sardina*. Este nivel de divergencia corresponde a 15 – 23 millones de años de separación basado en un reloj de proteínas para peces marinos, calibrado por divergencia genética entre especies hermanas del Atlántico y Pacífico separadas por la emergencia del Istmo de Panamá (Vawter y col. 1980). Posteriormente Grant y col. en 1998 utilizando secuencias de 220 pb de Cyt b encontraron un promedio de divergencia de 23.2% entre secuencias

de *Sardina* y *Sardinops*, basados en la calibración del reloj molecular de 2% por MA (Brown y col. 1979), este nivel de divergencia corresponde a un aislamiento ocurrido hace 11 MYA. Estos estudios representan evidencia favorable para el origen del género *Sardinops* durante el Mioceno medio.

La distribución actual del género *Sardinops* comprende las costas de Sud África, Australia-Nueva Zelanda, Chile, California y Japón (Burrige, 2002). Estudios de filogeografía del género, utilizando caracteres moleculares han mostrado la existencia de tres linajes independientes (Bowen & Grant, 1997; Grant & Bowen 1998), correspondientes a los siguientes clados: 1) Sud-África (*S. ocellatus*) - Australia (*S. neopilchardus*); 2) Japón (*S. melanostictus*); 3) Chile (*S. sagax*) - California (*S. caeruleus*). Diversos estudios moleculares han tenido como propósito estimar las fechas de este género. La figura 5 muestra la distribución para las cinco formas reconocidas del género *Sardinops* y el género *Sardina* (*Sardina pilchardus*) (Grant & Bowen, 1998). Cabe destacar la distribución antitropical en el Pacífico-Este para las formas *S. caeruleus* y *S. sagax*.

Grant & Leslie (1996), examinaron variabilidad electroforética de 8 aloenzimas polimórficas entre las 5 formas de *Sardinops*, encontrando distancias genéticas de promedios de 0.01. Asumiendo reloj molecular y doble calibración, por la emergencia del istmo de Panamá y apertura del Estrecho de Bering, esta distancia correspondería a una diversificación del género de hace alrededor de 0.2 MYA. Por otra parte Bowen y Grant (1997), estudiando un número promedio de 16 individuos por especie, estimaron la divergencia del género utilizando secuencias de 500 pb de la RC del DNA mitocondrial. Los autores encontraron divergencias promedios de 3.8%, asumiendo reloj molecular y la utilización de dos calibraciones distintas,

estimaron que la diversificación del género fue hace 0.3 – 0.5 MYA (calibración de 15 - 20% de divergencia por MY; Quinn, 1992; Stewart & Baker, 1994) a 0.7 – 1 MYA (calibración de 8 – 11% de divergencia por MY; Vigilant y col. 1991; Brown y col. 1993). Estudios de divergencia del género utilizando 220 pb de Citocromo b (Grant y col. 1998), mostraron divergencia ínter poblacional promedio de 2.3 – 2.8%. Para estimar la edad de la separación los autores utilizaron la tasa de sustitución silente del tercer codon de 10% de divergencia entre linajes por MY. Esta estimación (la misma utilizada previamente para vertebrados superiores, véase Irwin y col. 1991) sugiere que el ancestro común más reciente para el género existió hace 0.2 a 0.3 MY.

En otras palabras, todos estos estudios concluyen que las poblaciones del género *Sardinops* tuvieron su ancestro común más cercano durante el Pleistoceno. Las relaciones filogenéticas entre los géneros *Sardina* – *Sardinops*, incluyendo individuos de diversas localidades para el último género y utilizando el método del vecino más cercano (Neighbor – Joining), sugieren que los individuos del género *Sardinops* provenientes de Chile – Perú y California – México, se agrupan en un mismo clado (Grant & Bowen, 1998, Fig. 6). Debido a que distribución de estas especies no se sobrepone, es correcto suponer que estos individuos corresponden a las especies *S. sagax* y *S. caeruleus*, apoyando la hipótesis de especies hermanas (clado destacado en rojo).



La literatura discutida anteriormente describe adecuadamente la historia evolutiva de los géneros de interés, pero la información necesaria para establecer precisamente la cronología de la divergencia transecuatorial que en último término condujo a la distribución antitropical que observamos hoy en día en los tres grupos de especies estudiadas, es aún incompleta.

Dada la gran variedad de eventos climáticos que caracterizan la historia biogeográfica del Pacífico-Oriental, no es sencillo establecer si las distribuciones transecuatoriales actuales son producto de “vicarianza” (durante fragmentación continental en el Mesozoico, o surgimiento del Istmo de Panamá a fines del Plioceno) o “dispersión” (debido a glaciaciones del Pleistoceno) o una combinación de ambas. Por ello, el conocimiento de las fechas de separación entre especies es una información clave en la definición de los mecanismos de divergencia transecuatorial que fueron responsables de las distribuciones que observamos actualmente.

Uno de los grandes problemas que se presenta en el uso de técnicas moleculares para inferir divergencia entre especies, es la calibración del reloj molecular. Esto se debe, a que las tasas de divergencia entre linajes, genes y regiones genómicas son heterogéneas y las tasas de divergencia molecular de la mayoría de los taxa no es conocida, obligando a calibrar utilizando las estimaciones obtenidas para otros taxa (Swofford y col. 1996, Arbogast y col. 2002, BurrIDGE, 2002). Es importante reducir la incertidumbre inherente a la hipótesis del reloj molecular, una manera de lograrlo es homogenizar los datos obtenidos entre especies para hacerlos comparables, importante es además considerar más de un marcador molecular, utilizar un gran número de secuencias con el mayor número de caracteres posibles y realizar estimaciones de divergencia por distintos métodos (Ej. coalescencia y

cladogramas filogenéticos). A pesar del grado de incertidumbre que existe sobre la utilización del Reloj molecular, el uso conservativo de esta aplicación, permite diferenciar rangos de divergencia tales como mediados del Mioceno (15 MYA) versus Mesozoico (65 – 245 MYA) o Pleistoceno (menos de 1.64 MYA).

## 2.4 Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes discutidos, y bajo el supuesto de que las tasas mutacionales son similares para los tres grupos de especies, este trabajo abordará la siguiente hipótesis:

*Debido a las características comunes que presentan los géneros estudiados (género Trachurus, T. murphyi y T. symmetricus, género Engraulis, E. ringens y E. mordax y el género Sardinops, S. sagax y S. caeruleus) se espera encontrar que los tiempos de divergencia en los tres grupos de especies hermanas sean coincidentes con la emergencia del istmo de Panamá.*

## 2.5 Objetivos

### 2.5.1 Objetivo general

Establecer los tiempos de divergencia para tres pares de especies de peces marinos con distribución antitropical en el Pacífico Este, a partir del análisis de la región control y Citocromo b del DNA mitocondrial.

### 2.5.2 Objetivos específicos

I. Determinar las secuencias completas de la región control (RC) para las especies de *Trachurus murphyi* (Chile) y *Trachurus symmetricus* (California), *Engraulis ringens* (Chile), *Engraulis mordax* (California) y *Sardinops sagax* (Chile), *Sardinops caeruleus* (California).

II. Determinar las secuencias completas de Citocromo b (Cyt b) para las especies de *Trachurus murphyi* (Chile) y *Trachurus symmetricus* (California), *Engraulis ringens* (Chile), *Engraulis mordax* (California) y *Sardinops sagax* (Chile), *Sardinops caeruleus* (California).

III. Con la información obtenida en los objetivos I y II, establecer una concordancia entre la(s) fecha(s) de divergencia obtenidas a partir de la secuencia de mtDNA y las fechas correspondientes a eventos climáticos y/o oceanográficos críticos del Pacífico-Este.

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Obtención de muestras

Se recolectaron trozos de tejido muscular de muestras de jurel, anchoveta y sardinas de las costas del Pacífico-Este. Como parte de investigaciones anteriores (Fondecyt 1040785, proyecto de CORPESCA S.A) se contaba con muestras de *T. murphyi* y *T. symmetricus* y *E. ringens*. Para las especies del género *Trachurus* se contó con 173 muestras, 173 para el género *Engraulis* y 195 para el género *Sardinops*. La tabla 1 resume el número de individuos obtenidos por especie y localidad.

**Tabla 1.** Número de muestras total recolectadas, se muestra el detalle por género especie y localidad.

Género	Especie	Localidad	Número de muestras
<i>Trachurus</i> N = 173	<i>T. murphyi</i> N = 121	Iquique	30
		San Antonio	30
		Talcahuano	35
	<i>T. symmetricus</i> N = 52	Nueva Zelanda	26
		San Diego	28
<i>Engraulis</i> N = 173	<i>E. ringens</i> N = 126	California	24
		Perú	31
		Iquique	47
	<i>E. mordax</i> N = 47	Talcahuano	48
<i>Sardinops</i> N = 195	<i>S. sagax</i> N = 151	California	47
		Arica	55
		Antofagasta	59
		San Antonio	14
	<i>S. caeruleus</i> N = 44	Coquimbo	23
		California	44

Todas las muestras fueron preservadas en etanol 95% y para extracción de DNA, se utilizó el método de fenol-cloroformo (modificado a partir del descrito por Sambrook y col. 1989) y resuspendidos en 20 - 40 ul de agua ultra pura estéril.

El incremento del esfuerzo de muestreo necesario para determinar un nuevo haplotipo por localidad en ambos marcadores fué estimado de acuerdo a Helgason y col. (2000), obteniendo así el número apropiado de muestras a secuenciar con cada marcador.

### 3.2 Amplificaciones

#### 3.2.1 Región Control (RC) *Trachurus*

Se utilizaron partidores diseñados a partir de las secuencias de tRNA-Pro y tRNA-Phe de *T. japonicus* (AP003092) obtenida desde la base de datos GenBank (para detalles ver Poulin, 2004). El resultado de la amplificación son 825pb que corresponden a el nucleótido 9 al 833 de la RC de *T. japonicus* (GeneBank acceso AP003092, tamaño completo 862pb).

#### 3.2.2 Citocromo b (Cyt b) *Trachurus*

Los partidores para la amplificación de Cyt b fueron diseñados a partir de secuencias de tRNA-Glu y tRNA-Thr de miembros de la familia *Carangidae* (Cárdenas y col. 2005), amplificando Cyt completo (1141pb).

#### 3.2.3 Región Control (RC) *Engraulis*

Para la amplificación de esta región se diseñaron partidores a partir de las secuencias de tRNA-Pro y 12S ribosomal RNA de *E. japonicus* (Dla-F: TCC CAC CAC TAG CTC CCA AAG y Dla-R: TGC GGA GAC TTG CAT GTG TAA), secuencias obtenida desde la base de datos GenBank (NC\_003097), el producto de PCR amplificado fue de 922pb correspondientes a la zona desde el nucleótido 75 a 966 de la RC de *E. japonicus* (tamaño completo: 1124pb).

#### 3.2.4 Citocromo b (Cyt b) *Engraulis*

Para la amplificación de Cyt b del género *Engraulis* se utilizó como partidor de la hebra liviana el descrito por Irwin y col. (1991), (L14724: CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G) y un partidor degenerado de hebra pesada, descrito por Grant y col. (2005) (H15149: TTG AGC CCY GCT GGG TTR TTA GAT) a partir de partidores previos diseñados por Taberlet y col. (1992). El tamaño

del producto amplificado fue de 612pb correspondiente a la zona entre los nucleótidos 47 y 658 de *E. japonicus* (se pueden obtener variaciones producto del alineamiento) (GenBank acceso NC\_003097, tamaño completo 1141pb).

### **3.2.5 Región Control (RC) *Sardinops***

Se diseñaron partidores a partir de las secuencias de tRNA-Thr y 12S ribosomal RNA de *S. melanostictus* (Sard1-F: TTC CAC CTC TAA CTC CCA AAG y Sard1-R TGC GGA GGC TTG CAT GTG TAA) obtenida desde la base de datos GenBank (NC\_002616S), el producto resultante de la amplificación fue de 1133-1136pb, correspondientes a la zona desde el nucleótido 39 al 1171 de *S. melanostictus* (GenBank acceso NC\_002616, tamaño completo 1202pb).

### **3.2.6 Citocromo b (Cyt b) *Sardinops***

Para la amplificación de Cyt b se usaron los partidores descritos por Lecomte y col.2004 (partidor de hebra liviana, SardLight: AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTCA y partidor de hebra pesada, SardHeav: GTG ACT TGA AAA ACC ACC GTT G). El producto resultante de la amplificación fue de 402pb, correspondiente a la zona desde el nucleótido 1 al 402 de *S. melanostictus* (GenBank acceso NC\_002616, tamaño completo 1141pb).

Las tablas 2, 3 y 4 resumen las condiciones utilizadas en la amplificación por PCR para los tres pares de especies y los dos segmentos mitocondriales estudiados.



**Tabla 2:** Condiciones optimizadas para la amplificación por PCR de la RC y Cyt b de las especies del género *Trachurus* (*T. murphyi* y *T. symmetricus*). En cuadros pintados se muestran los pasos de PCR que forman parte de los ciclos repetitivos de la PCR.

Género	Región Control (RC)					Citocromo b (Cyt b)				
	Reactivos	Concentración	Paso de PCR	T°C	Tiempo	Reactivos	Concentración	Pasos de PCR	T°C	Tiempo
<i>Trachurus</i>	Taq polimer.	0.2 U	Denat. inicial	95	5 min	Taq polimer.	0.2 U	Denat. inicial	95	5 min
	Buffer	1X	Denaturación	94	30 seg	Buffer	1X	Denaturación	94	30 seg
	dNTPs	0.2 mM c/u	Annealing	56	55 seg	dNTPs	0.2 mM c/u	Annealing	55	90 seg
	Partidor	10 pmol c/u				Partidor	10 pmol c/u			
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	Extensión	72	45 seg	MgCl <sub>2</sub>	3.2 mM	Extensión	72	45 seg
	DNA templ.	5 -10 ng	núm. ciclos	30		DNA templ.	5 ng	Núm. ciclos	30	
	Vol. final	15 ul	Extensión final	72	10 min.	Vol. final	20 ul	Extensión final	72	10 min.

**Tabla 3:** Condiciones optimizadas para la amplificación por PCR de la RC y Cyt b de las especies del género *Engraulis* (*E. ringens* y *E. mordax*). En cuadros pintados se muestran los pasos de PCR que forman parte de los ciclos repetitivos de la PCR.

Género	Región Control (RC)					Citocromo b (Cyt b)				
	Reactivos	Concentración	Paso de PCR	T°C	Tiempo	Reactivos	Concentración	Pasos de PCR	T°C	Tiempo
<i>Engraulis</i>	Taq polimer.	2.5 U	Denat. inicial	94	5 min	Taq polimer.	2,5 U	Denat. inicial	95	3 min
	Buffer	1X	Denaturación	94	30 seg	Buffer	1X	Denaturación	94	30 seg
	dNTPs	0.2 mM c/u	Annealing	55	1 min	dNTPs	0.05 mM c/u	Annealing	58	40 seg
	Partidor	3 pmol c/u				Partidor	10 pmol c/u			
	MgCl <sub>2</sub>	3.2 mM	Extensión	72	45 seg	MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM	Extensión	72	40 seg
	DNA templ.	50 ng	núm. ciclos	30		DNA templ.	200 ng	Núm. ciclos	30	
	Vol. final	25 ul	Extensión final	72	10 min.	Vol. final	25 ul	Extensión final	72	3 min.

**Tabla 4:** Condiciones optimizadas para la amplificación por PCR de la RC y Cyt b de las especies del género *Sardinops* (*S. sagax* y *S. caeruleus*). En cuadros pintados se muestran los pasos de PCR que forman parte de los ciclos repetitivos de PCR.

Género	Región Control (RC)					Citocromo b (Cyt b)				
	Reactivos	Concentración	Paso de PCR	T°C	Tiempo	Reactivos	Concentración	Pasos de PCR	T°C	Tiempo
<i>Engraulis</i>	Taq polimer.	2.5 U	Denat. inicial	94	5 min	Taq polimer.	2.5 U	Denat inicial	94	3 min
	Buffer	1X	Denaturación	94	30 seg	Buffer	1X	Denaturación	94	30 seg
	dNTPs	0.2 mM c/u	Annealing	60	1:30 min	dNTPs	0.05 mM c/u	Annealing	54	40 seg
	Partidor	5 pmol c/u				Partidor	10 pmol c/u			
	MgCl <sub>2</sub>	3.2 mM	Extensión	72	1:30 min	MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM	Extensión	72	40 seg
	DNA templ.	50 ng	núm. ciclos	30		DNA templ.	400 ng	Núm. ciclos	24	
	Vol. final	25 ul	Extensión final	72	10 min.	Vol. final	25 ul	Extensión final	72	3 min.

La secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, fue realizada por la empresa Coreana Macrogen, en secuenciador automático ABI 3100 de Applied Biosystems.

[http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen\\_main.jsp](http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp).

### 3.3 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y verificadas con el programa Proseq versión 2.91 (Filatov, 2002), el alineamiento inicial se realizó con el programa ClustalX 1.8 (Thompson y col. 1997) y alineamiento final por ojo. Para medir si existe saturación en la sustitución nucleotídica en el conjunto de secuencias alineadas por marcador y especie se usó el programa DAMBE, 4.5.55 (Xia & Xie, 2001), que permite evaluar si las secuencias son aptas para su uso en análisis filogenéticos.

Se estimaron índices de diversidad estándar: número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (h), número de sitios polimórficos (S), número promedio de

diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ), número promedio de diferencia entre pares de secuencias de distinta especie ( $\Pi$ inter) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), utilizando el programa DnaSP v. 4.0 (Rozas & Rozas, 1999) y Arlequín 2.0 (Schneider y col. 2000) a partir de las secuencias de la RC y Cyt b. Las relaciones genéticas entre haplotipos fueron graficadas por network median-joining utilizando el programa Network 4.2.0.1 (Bandelt y col. 1999).

Para estimar el grado de diferenciación existente entre individuos de cada par de especies hermanas se utilizó el programa Arlequín 2.0 (Schneider y col. 2000) para calcular un índice F-estadístico ( $F_{st}$ ) de acuerdo a Reynolds y col. 1983, el nivel de significancia se estimó utilizando un test de significancia de 1000 permutaciones.

### 3.4 Análisis Filogenético

Para la construcción de los árboles filogenéticos se usaron como grupo externo las siguientes especies: para el género *Trachurus* se empleo *T. picturatus* (AY533477, RC y AY526546, Cyt b), *T. japonicus* (AP003092), *T. trachurus* (NC\_006818), *T. lathami* (AF363748) y *T. trecae* (AY050740). Para el género *Engraulis* los taxa empleados para enraizar los distintos árboles filogenéticos fueron *Coilia nasus* (NC\_009579, RC), *E. japonicus* (NC\_003097) y *E. encrasicolus* (NC\_009581) y en la reconstrucción filogenética del género *Sardinops* se uso *S. melanostictus* (NC\_002616).

La reconstrucción de árboles filogenéticos se realizó por medio de tres aproximaciones: Algoritmo de agrupamiento del Vecino mas cercano (NJ) (Saitou & Nei, 1987) en el programa Mega v 3.1 (Kumar y col. 2004) y criterios de optimización de Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML), utilizando

el programa PAUP\* v 4.0 b10 (Swofford, 2002). Para las construcciones filogenéticas de los haplotipos de RC con MP y ML en el género *Engraulis*, se escogió una sub muestra (10 haplotipos por especie) manteniendo la estructura por localidad, con el fin de hacer una reducción en los haplotipos hasta hacerlos computacionalmente tratables. Para las especies del género *Sardinops* se utilizaron 20 haplotipos por especie escogidos con igual criterio. En la construcción filogenética por ML se buscó el modelo de evolución molecular más simple que explicara los datos, mediante el programa Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998), la selección del modelo se realizó por el Criterio de información de Akaike (AIC) (Felsenstein, 1981). La búsqueda del árbol filogenético por ML se implementó con búsqueda heurística usando adición de secuencia ordenada y intercambio de ramas (TBR Branch Swapping algorithm) (Nei & Kumar, 2000). El soporte de los nodos para las distintas aproximaciones filogenéticas fue estimado con el método de remuestreo por bootstrap (Felsenstein, 1981) usando 1000 réplicas.

### **3.5 Estimación tiempos de divergencia:**

#### **3.5.1 Por Coalescencia**

El tiempo de divergencia por coalescencia se estimó de acuerdo a la teoría formulada por Kingman (1982) y desarrollada por Hudson (1991), Griffiths & Tavaré (1994), Donnelly & Joyce (1992), consiste en la reconstrucción de la historia genealógica de una muestra de secuencias hasta el ancestro común más reciente (MRCA) (Rosenberg & Nordborg, 2002). Se calculó el número promedio de diferencias entre par de secuencias tomada cada una en especies diferentes dentro del mismo género (inter) con el programa DnaSP v. 4.0 (Rozas y Rozas 1999), y de

acuerdo a la teoría de coalescencia de genes, se calculó la divergencia neta entre dos linajes ( $\Pi$ ) que es igual a  $2\lambda T$ , donde  $\lambda$  es el número de sustituciones por nucleótido por año y  $T$  es el tiempo transcurrido desde la divergencia (Nei, 1987).

### **3.5.2 Por reconstrucción filogenética:**

Para evaluar los árboles filogenéticos encontrados por ML se estimó la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las ramas del cladograma, mediante Likelihood Ratio Test (LRT) (Felsenstein, 1981), que evalúa la existencia de diferencias significativas entre topologías obtenidas con reloj molecular esforzado contra no esforzado. En todo los casos las topologías no fueron significativamente distintas, por tanto se calculó el tiempo de escisión entre especies hermanas con el programa Mega v 3.1 (Kumar y col. 2004) aplicando tasas mutacionales especificadas más adelante.

### **3.5.3 Tasas mutacionales empleadas:**

Para la calibración del reloj molecular de las secuencias de RC, se utilizaron dos calibraciones distintas para cada segmento de mtDNA analizado: para RC a) una tasa de 3,6 % de divergencia entre secuencias por millón de años (Donaldson & Wilson, 1999), b) 8 % de divergencia entre secuencias por MA (Vigilant y col., 1989; Brown y col. 1993), para Cyt b a) 0,15% de divergencia entre secuencia por MY (Cárdenas y col. 2005), b) 1% - 2% de divergencia entre secuencias por MA (Bermingham y col. 1997, Brown y col. 1979).

## 4.- RESULTADOS

### 4.1 *Trachurus*

#### 4.1.1 Variación secuencias RC

No se encontró variación en el largo de las secuencias de RC para las dos especies del género *Trachurus*. De las 825 posiciones nucleotídicas secuenciadas 796 fueron sitios invariantes y 29 fueron sitios variantes (23 informativos para parsimonia), presentando 30 sustituciones distintas (22 transiciones y 8 transversiones). La composición nucleotídica es: 31.3% A, 16.7% G, 29.9% T, 22.1% C. El test de saturación en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0.340 < I_{ss.c} 0.783$ ;  $df=921$   $p < 0.0000$ ), validándolas para sus uso en filogenia. El número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) fue  $7.62 \pm 3.57$  ( $\Pi = 0.400 \pm 0.374$  *T. murphyi*;  $\Pi = 1.028 \pm 0.698$  *T. symmetricus*), el número de diferencias nucleotídicas fijadas entre las dos especies es 9, y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre las especies ( $\Pi_{inter}$ ) es 17,33 (2,1% de divergencia promedio). Se encontró un total de 26 haplotipos, 13 para cada especie y las dos especies del género estudiadas no presentaron haplotipos compartidos. El índice de diversidad H para las dos especies juntas fue  $0.638 \pm 0.039$  y para las especies por separado: *T. murphyi*:  $0.315 \pm 0.055$  y *T. symmetricus*  $0.693 \pm 0.066$  (ver figura 7 y anexo 1). El valor de  $F_{st}$  encontrado entre las dos especies es 0.97 ( $p = 0.00000$ , 10000 permutaciones), lo que sería reflejo de grupos muy diferenciados genéticamente (tabla 5).

#### 4.1.2 Variación secuencias Cyt b

No se encontró variación en el largo de las secuencias de Cyt b para las dos especies del género *Trachurus*. De las 1141 posiciones nucleotídicas estudiadas 1131

fueron sitios invariantes y 10 fueron sitios variantes (los 10 sitios son informativos para parsimonia), presentando un total de 10 sustituciones (8 son transiciones y 2 transversiones). La composición nucleotídica es: 23.6% A, 15.4% G, 27.8% T, 32.3% C. El test de saturación en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0,0367 < I_{ss.c} 0.8241$ ;  $df = 1140$   $p < 0.0000$ ), esto valida su uso para filogenia. El número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) fue  $5.33 \pm 2.99$  ( $\Pi = 0$  *T. murphyi*;  $\Pi = 0$  *T. symmetricus*), y el número de diferencias nucleotídicas fijadas entre las dos especies es 10,  $\Pi_{inter} = 10$  (0.09% de divergencia promedio). Se encontró un total de 2 haplotipos, uno para cada especie. El índice de diversidad H para las dos especies fue  $0.533 \pm 0.172$  y para las especies por separado fue: *T. murphyi*: 0 y *T. symmetricus*: 0 (ver figura 8 y anexo 1). El valor de  $F_{st}$  encontrado entre las dos especies es 1 ( $p = 0.06738$ , 10000 permutaciones, valor de p no significativo producto del bajo número de individuos analizados), lo que reflejaría dos grupos altamente diferenciados (tabla 5).

## 4.2 *Engraulis*

### 4.2.1 Variación secuencias RC

No se encontró variación en el largo de las secuencias de RC, 922pb para las dos especies del género *Engraulis*, sin embargo al realizar alineamiento entre las secuencias se obtuvo un tamaño final de 929pb. De las 929 posiciones nucleotídicas finales 719 fueron sitios invariantes y 203 fueron sitios variantes (167 informativos para parsimonia), presentando 212 sustituciones distintas (128 transiciones y 84 transversiones), 15 sitios presentaron indels. La composición nucleotídica es: 29.13% A, 15.10% G, 33.01% T, 22.75% C. El test de saturación en la sustitución mostró

que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0.0172 < I_{ss.c} 0.7421$ ;  $df = 824$   $p < 0.0000$ ), validando su uso en filogenia. El número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) fue  $65.732 \pm 24.482$  ( $\Pi = 2.33 \pm 1.282$  *E. ringens*;  $\Pi = 9,034 \pm 4,234$  *E. mordax*); y el número de diferencias nucleotídicas fijadas entre las dos especies es 128, el número promedio de diferencias nucleotídicas entre las especies ( $\Pi_{inter}$ ) es 157.03 (16.9% de divergencia promedio). Se encontró un total de 84 haplotipos, ningún haplotipo fue compartido entre las especies, de estos 40 haplotipos pertenecen a *E. ringens* y 44 a *E. mordax*. El índice de diversidad H para las dos especies fue  $0.94 \pm 0.0130$  y para las especies por separado fue: *E. ringens*  $0.883 \pm 0.022$  y *E. mordax*  $0.997 \pm 0.005$  (ver figura 9 y anexo 1). El valor de  $F_{st}$  encontrado entre las dos especies es 0.97 ( $p = 0.00000$ , 10000 permutaciones), lo que sería reflejo de grupos muy diferenciados genéticamente.

#### 4.2.2 Variación secuencias Cyt b

No se encontró variación en el largo de las secuencias de Cyt b para las dos especies del género *Engraulis*. De las 612 posiciones nucleotídicas estudiadas 516 fueron sitios invariantes y 96 fueron sitios variantes (93 informativos para parsimonia), presentando 100 sustituciones distintas (75 transiciones y 25 transversiones). La composición nucleotídica es: 25.01% A, 17.98% G, 30.09% T, 26.92% C. El test de saturación en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0,0560 < I_{ss.c} 0,4990$ ;  $df = 611$   $p < 0.0000$ ), esto las valida para sus uso en filogenia. El número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) fue  $47.066 \pm 20.671$  ( $\Pi = 0,133 \pm 0.204$  *E. ringens*;  $\Pi = 3,375 \pm 1,1778$  *E. mordax*) y el número de diferencias nucleotídicas fijadas entre las dos especies es 79, el número promedio de diferencias nucleotídicas entre las especies ( $\Pi_{inter}$ ) es 90.8 (14.84% de



divergencia promedio). Se encontró un total de 19 haplotipos, ningún haplotipo fue compartido entre las especies, 3 haplotipos encontrados en *E. ringens* y 16 para *E. mordax*. El índice de diversidad H para las dos especies juntas fue  $0.762 \pm 0.053$  y para las especies por separado fue: *E. ringens*  $0.131 \pm 0.082$  y *E. mordax*  $0.899 \pm 0.044$  (ver figura 10 y anexo 1). El valor de Fst encontrado entre las dos especies es 0.98 ( $p = 0.00000$ , 10000 permutaciones) lo que indicaría grupos muy diferenciados genéticamente.

### 4.3 *Sardinops*

#### 4.3.1 Variación secuencias RC

Se encontró variación en el largo de las secuencias de RC para las dos especies del género *Sardinops* (1133 pb *S. sagax*; 1136 pb *S. caeruleus*), al realizar alineamiento entre las secuencias se obtuvo un tamaño final de 1137 pb, de estos sitios 906 fueron sitios invariantes y 231 fueron sitios variantes (152 informativos para parsimonia), presentando 252 sustituciones distintas (199 transiciones y 53 transversiones), 16 sitios presentaron indels. La composición nucleotídica es: 27.75% A, 26.08% G, 23.93% T, 22.24% C. El test de saturación en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0.046 < I_{ss.c} 0.462$ ;  $df = 1138$   $p < 0.0000$ ), esto valida su uso en filogenias. El número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) fue  $22.347 \pm 9.885$  ( $\Pi = 19.46 \pm 8.66$  *S. sagax*;  $\Pi = 23.14 \pm 10.38$  *S. caeruleus*); y el número de diferencias nucleotídicas fijadas entre las dos especies es 0, el número promedio de diferencias nucleotídicas entre las especies ( $\Pi_{inter}$ ) es 26.866 (2.36% de divergencia promedio). Se encontró un total de 170 haplotipos, sin haplotipos compartidos entre las especies, de estos 127 haplotipos

pertenecen a *S. sagax* y 43 a *S. caeruleus*. El índice de diversidad H para las dos especies fue  $0.998 \pm 0.009$  y para las especies por separado fue:  $0.997 \pm 0.0015$  *S. sagax* y *S. mordax*  $0.999 \pm 0.005$  (ver figura 11 y anexo 1). El valor de Fst encontrado entre las dos especies es 0.224 ( $p = 0.00000$ , 10000 permutaciones), lo que indicaría un nivel de diferenciación mucho menor que en los géneros anteriores.

#### 4.3.2 Variación secuencias Cyt b

No se encontró variación en el largo de las secuencias de Cyt b para las dos especies del género *Sardinops* (402 pb), de los sitios secuenciados 378 fueron sitios invariantes y 24 fueron sitios variantes (8 informativos para parsimonia), presentando 24 sustituciones distintas (24 transiciones y 0 transversiones). La composición nucleotídica es: 23.08% A, 20.21% G, 30.04% T, 26.68% C. El test de saturación en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $Iss = 0,0106 < Iss.c = 0,3952$ ;  $df=401$   $p < 0.0000$ ), esto las valida para sus uso en filogenia.

El número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) fue  $1.97 \pm 1.13$  ( $\Pi = 1.874 \pm 1.102$  *S. sagax*;  $\Pi = 1.77 \pm 1.05$  *S. caeruleus*); y el número de diferencias nucleotídicas fijadas entre las dos especies es 0, el número promedio de diferencias nucleotídicas entre las especies es 2.109 (0.52% de divergencia promedio). Se encontró un total de 28 haplotipos, 3 haplotipos compartidos entre las especies, 16 haplotipos presentes en *S. sagax* y 15 haplotipos en *S. caeruleus*. El índice de diversidad H para las dos especies fue  $0.932 \pm 0.0176$  y para las especies por separado fue:  $0.919 \pm 0.0318$  *S. sagax* y *S. mordax*  $0.883 \pm 0.042$  (ver figura 12 y anexo 1). El valor de Fst encontrado entre las dos especies es 0.136 ( $p = 0.000000$ , 10000 permutaciones), lo que nuevamente reflejaría una diferenciación menor a la de los otros dos géneros.

**Tabla 5:** resultados obtenidos para la región control de mtDNA en los tres géneros estudiados, N = tamaño de la muestra, n° de nucl = tamaño de la región analizada, S = número de sitios polimórficos, K = número de haplotipos, h = diversidad haplotípica,  $\Pi$  = número promedio de diferencias entre secuencias,  $\Pi$ inter = número promedio de diferencias entre secuencias de especies distintas,  $\pi$  = diversidad nucleotídica ( $\Pi/n^\circ$ nucl), % de diver = % de divergencia entre las especies.

Género	Especie	N	n° de nucl.	S	K	h	$\Pi$ o $\Pi$ inter	$\pi$	% de diver.	Fst
<i>Trachurus</i>	<i>T. murphyi</i>	121	825	12	13	0.32	0.40	0.00048	-	-
	<i>T. symmetricus</i>	52	825	11	13	0.69	1.03	0.0012	-	-
	Juntas	173	825	29	26	0.64	17.33	0.021	2.10	0.97
<i>Engraulis</i>	<i>E. ringens</i>	126	922	26	40	0.88	2.33	0.0025	-	-
	<i>E. mordax</i>	47	922	56	44	0.99	9.03	0.0098	-	-
	Juntas	173	929	203	84	0.94	157.031	0.17	16.9	0.97
<i>Sardinops</i>	<i>S. sagax</i>	151	1133	189	127	0.99	19.46	0.017	-	-
	<i>S. caeruleus</i>	44	1136	143	43	0.99	23.14	0.020	-	-
	Juntas	195	1137	231	170	0.99	26.87	0.024	2.36	0.24

**Tabla 6:** resultados obtenidos para Cyt b de mtDNA en los tres géneros estudiados, N = tamaño de la muestra, n° de nucl = tamaño de la región analizada, S = número de sitios polimórficos, K = número de haplotipos, h = diversidad haplotípica,  $\Pi$  = número promedio de diferencias entre secuencias,  $\Pi$ inter = número promedio de diferencias entre secuencias de especies distintas,  $\pi = \Pi/n^\circ$ nucl, % de diver = % de divergencia entre las especies.

Género	Especie	N	n° de nucl.	S	K	h	$\Pi$ o $\Pi$ inter	$\pi$	% de diver.	Fst
<i>Trachurus</i>	<i>T. murphyi</i>	4	1141	0	1	0	0	0	-	-
	<i>T. symmetricus</i>	2	1141	0	1	0	0	0	-	-
	Juntas	6	1141	10	2	0.53	10	0.0088	0.9	1
<i>Engraulis</i>	<i>E. ringens</i>	30	612	2	3	0.13	0.13	0.0021	-	-
	<i>E. mordax</i>	30	612	19	16	0.89	3.38	0.0055	-	-
	Juntas	60	612	96	19	0.76	90.8	0.15	14.8	0.98
<i>Sardinops</i>	<i>S. sagax</i>	30	402	14	16	0.92	1.87	0.0047	-	-
	<i>S. caeruleus</i>	30	402	14	15	0.88	1.77	0.0044	-	-
	Juntas	60	402	24	28	0.93	2.11	0.0052	0.52	0.14

#### 4.4 Análisis Filogenético

Para una primera aproximación a las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de cada par de especies hermanas se utilizó el algoritmo de agrupamiento de Vecino más cercano utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980) que da un peso diferente a las transiciones y transversiones (Fig. 13 y 14).

##### 4.4.1 Género *Trachurus*

###### 4.4.1.1 Región Control (RC)

En los análisis filogenéticos para RC y Cyt b de las especies del género *Trachurus* se utilizó como grupo externo un haplotipo de *T. trachurus* y dos haplotipos de *T. picturatus*. En la aproximación por MP para RC se encontraron 10 árboles igualmente parsimoniosos, resultado árboles con 81 pasos (índice de consistencia (IC) = 0.81, índice de homoplasia (IH) = 0.18, índice de retención (IR) = 0.9345; Fig. 15). La topología de los 10 árboles muestra solo diferencias a nivel intraespecífico, esto queda corroborado por el alto soporte de los tres nodos basales (bootstrap > 90%).

Resultado de ModelTest entrega que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es TrN+I. La búsqueda heurística entregó solo una topología más probable por ML con un valor de Log likelihood (-LN L) = 1640.76977 con altos valores de bootstrap en el nodo que muestra la escisión del ancestro común a *T. murphyi* y *T. symmetricus* y en los nodos que agrupan a los haplotipos intraespecie (Fig. 16). Para evaluar la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las ramas se realizó LRT resultando no significativo (LRT =  $2*(1652.99752-1639.33387) = 27.3273$ ;  $\chi^2_{(27, 0.05)} = 40.11$ ).

#### 4.4.1.2 Citocromo b (Cyt b)

Para el análisis filogenético de los haplotipos de Cyt b – genero *Trachurus* se utilizó como grupo externo las siguientes especies: *T. picturatus*, *T. trachurus*, *T. lathami* y *T. trecae*. Ambas aproximaciones (MP y ML) entregaron árboles con igual topología. El árbol entregado por MP presenta 94 pasos (IC = 0.91, IH = 0.08, IR = 0.79) y un fuerte soporte por bootstrap en el nodo de escisión de los haplotipos de *T. murphyi* y *T. symmetricus* (Fig. 17). Aplicando ModelTest a las secuencias utilizadas para la construcción filogenética por ML el modelo que mejor explica los datos es TrN+I presentando un valor de  $-\ln L = 2105.84665$  y al igual que el árbol por MP se observa alto soporte en el nodo que une las dos especies estudiadas (Fig. 18). Para evaluar la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las ramas se realizó LRT resultando no significativo ( $LRT = 2(2108.13455 - 2103.64893) = 8,97134$ ,  $\chi^2_{(4, 0.05)} = 9,488$ ).

#### 4.4.2 Género *Engraulis*

##### 4.4.2.1 Región Control (RC)

En los análisis filogéticos para RC y Cyt b de las especies del género *Engraulis* se utilizó como grupo externo haplotipos de *E. japonicus* y *E. encrasicolus*. Por la aproximación de MP y 10 haplotipos por localidad en las secuencias de RC se encontraron 1494 árboles con igual largo total de ramas (295 pasos, IC = 0.92, IH = 0.08, IR = 0.93), todos mantienen la misma topología a nivel interespecie y solo difieren en las relaciones filogenéticas entre haplotipos de una misma especie, lo que se corrobora por los altos valores de bootstrap en los tres nodos, 72 a 100%; (Fig. 19).

Resultado de ModelTest entrega que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es HKY+G sin sitios invariantes y distribución gamma de las tasas de sustitución por sitio con un  $\alpha = 0.3190$ . La búsqueda heurística por ML entregó solo una topología más probable, con un valor de  $-\ln L = 2711.69188$ , la topología del árbol a nivel interespecie es la misma a la encontrada por MP y los tres nodos descritos para el árbol anterior presentan soporte de bootsatrap máximo (Fig. 20). Para evaluar la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las ramas se realizó LRT resultando no significativo con un valor de  $p = 0.03$  ( $LRT = 2(2468.40374 - 2458.83203) = 19.14342, \chi^2_{(10, 0.03)} = 19.92$ ).

#### 4.4.2.2 Citocromo b (Cyt b)

Se realizó análisis filogenético con el total de los haplotipos de Cyt b encontrados, las especies ocupadas como grupo externo fueron *Coilia nasus* (sinonimia con *Coilia ectenes*) y *Engraulis japonicus*. Por la aproximación de MP se encontraron 12 árboles con igual largo total de ramas (239 pasos, IC = 0.88, IH = 0.12, IR = 0.75) todos con la misma topología a nivel interespecie y altos valores de bootstrap en el nodo de escisión de las dos especies estudiadas y en los nodos que conectan los haplotipos intraespecíficos (Fig. 21). Resultado de ModelTest entrega que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es TrN+I. La búsqueda heurística por ML entregó solo una topología más probable, con un valor de  $-\ln L = 1595.04497$ , la topología del árbol a nivel interespecie es la misma a la encontrada por MP, los nodos del grupo interno tienen soporte entre 70% y 100 % (Fig. 22). Para evaluar la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las ramas se realizó LRT resultando no significativo ( $LRT = 2(1507.3907 - 1503.00679) = 8.767, \chi^2_{(6, 0.05)} = 12.59$ ).

### 4.4.3 Género *Sardinops*

#### 4.4.3.1 Región Control (RC)

Como grupo externo para las estimaciones de MP y ML con secuencias de la RC se utilizó *Sardinops melanostictus*. Para las estimaciones con MP se encontraron 105 árboles con igual largo de ramas (largo del árbol = 398, IC = 0.42, IH = 0.57, IR = 0.55), en los cuales destacan bajos valores de consistencia y altos valores de homoplasia. Al contrario de lo ocurrido en las estimaciones filogenéticas de las especies antes descritas, las especies hermanas del Pacífico Este del género *Sardinops* no muestran un solo clado de escisión entre los haplotipos de las dos especies. Las topologías encontradas muestran mayoritariamente a dos clados hermanos que agrupan por un lado a 19 haplotipos de *S. sagax* y por otro a 14 haplotipos de *S. caeruleus*, el haplotipo restante de la especie de sardina del Pacífico sur-este se agrupa en un clado con 4 haplotipos de *S. caeruleus*, la figura 23 muestra uno de los 105 árboles igualmente parsimoniosos encontrados, cabe destacar que solo un nodo tiene soporte por bootstrap mayor a 50% que agrupa a 11 haplotipos de *S. caeruleus* (Fig. 23). Resultado de ModelTest entrega que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es K81uf+I+G, el que incluye sitios invariantes y una distribución gamma de las tasas de sustitución por sitio con un  $\alpha = 0.4957$ . La búsqueda heurística por ML entregó solo una topología más probable, con un valor de  $-\ln L = 3627.32676$ , sin embargo ningún nodo tiene valor de bootstrap mayor a 50% (Fig. 24). Árbol filogenético estimado por ML con todos los haplotipos encontrados en el género, mantiene una topología similar pero no aumenta el valor de soporte por bootstrap en los nodos (árbol no se muestra).

#### 4.4.3.2 Citocromo b (Cyt b)

Se realizó el análisis filogenético con el total de los haplotipos de Cyt b encontrados, la especie ocupada como grupo externo fué *S. melanostictus*. Por la aproximación de MP se encontraron 729 árboles con igual largo total de ramas (33 pasos, IC = 0.81, IH = 0.18, IR = 0.71), la figura 25 muestra uno de estos árboles donde se observa que no se resuelven la gran mayoría de los nodos, por lo cual no es posible inferir las relaciones filogenéticas entre los haplotipos. Resultado de ModelTest entrega que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es TrN+I. La búsqueda heurística por ML entregó 4 árboles con igual valor de probabilidad ( $-\ln L = 768.61229$ ), figura 26 muestra uno de estos árboles, esta aproximación filogenética nuevamente no resuelve las relaciones de parentesco entre los haplotipos.

#### 4.5 Estimación de tiempos de divergencia:

Con los datos obtenidos se calculó la divergencia entre especies hermanas para los tres géneros utilizando la aproximación de coalescencia. La tabla 7 muestran los tiempo de divergencia expresados en unidad de tiempo mutacional, esta estimación hace comparable entre los tres géneros estudiados las sustituciones encontradas por gen, ya que considera además de las diferencias nucleotídicas el número de nucleótidos estudiados, permitiendo entonces estandarizar las diferencias encontradas.



**Tabla 7:** Distancias encontradas en los distintos géneros y las dos zonas del DNA mitocondrial estudiadas, expresado en unidad de tiempo mutacional (1/u) (tiempo necesario para se fije una mutación por linaje en cada 100 nucleótidos).

<b>Género</b>	<b>Región Control</b>	<b>Citocromo b</b>
<i>Trachurus</i>	1.050	0.450
<i>Engraulis</i>	8.452	7.418
<i>Sardinops</i>	1.181	0.262

## 5.- DISCUSION

La hipótesis del reloj molecular (tasa relativamente constante de evolución molecular), cuyo primer adelanto fue dado por Zuckerkandl & Paulin en 1965 y posteriormente en 1968 fue esbozada por Kimura, ha sido una de las herramientas más utilizadas en biología (Bromham & Penny, 2003). Aún así, existe gran controversia sobre los criterios para su aplicación (ver Pulquério & Nichols, 2006). Uno de los mayores debates ha estado enmarcado sobre el grado de heterogeneidad de las tasas (número de sustituciones acumuladas por millón de años) entre linajes, genes e incluso regiones génicas. A nivel científico existe acuerdo, basado en la gran cantidad de datos moleculares acumulados en las últimas dos décadas, que el concepto de reloj molecular del mtDNA “universal” ha sido remplazado por la noción de una tasa taxonómica “local” (Swofford y col., 1996, Yoder & Yang, 2000). La discusión en torno los factores que determinan la tasa de evolución molecular y que hace que esta varíe entre especies ha abarcado principalmente cuatro líneas. Un nivel de discusión se basa en los coeficientes de selección, según el cual fuerzas tales como la selección y la deriva afectarían la tasa de evolución molecular (Teoría Casi Neutral, Ohta & Kimura, 1971; Ohta, 2002) describiendo que esta puede variar no solo con cambios en la tasa mutacional, si no que también a través del balance entre selección – deriva. Un segundo nivel de argumentación cuestiona al tamaño poblacional como factor determinante de las tasas de sustitución, producto de una mayor probabilidad de ocurrencia de mutaciones. Sin embargo, Kimura (1971, 1983) justifica la independencia de la tasa mutacional al tamaño poblacional planteando que aunque mayores tamaños producen más mutaciones, la probabilidad

de que estas se fijen declina proporcionalmente al tamaño poblacional (para un modelo que apoya la independencia entre tamaño poblacional y tasa mutacional ver Cherry, 1998). Una tercera línea de discusión se ha generado en torno al efecto de variables ambientales sobre la tasa mutacional destacando el rol de la temperatura ambiental (Bromham, 2003, Held, 2001) y la energía biológicamente disponible (Wright, 2003, Pawar, 2005). La última línea de investigación en torno a este tema, y que es la más ampliamente aceptada, realza la importancia de la eficiencia en las enzimas involucradas en la reparación del DNA, diferencias en tasas metabólicas, tiempo generacional y tamaño corporal (Martin & Palumbi, 1993; Martin, 1993, 1995, Bromham, 2002, Mores & Harvey, 1994). Debido a que estos rasgos son heredables y tienden a ser similares entre especies emparentadas filogenéticamente, esta línea apoya la existencia de un reloj molecular “local” a nivel taxonómico (Arbogast y col., 2002, Bromham & Penny, 2003, Martin & Palumbi, 1993).

Las características comunes que presentan los tres pares de especies estudiadas (grandes tamaños poblacionales, ecosistemas caracterizados por sistemas de surgencia con temperaturas inferiores a los 25°C, similitudes filogenéticas que los agrupan dentro de una misma infraclase “teleósteos”) hace razonable aplicar una misma tasa mutacional para todas ellas, sin embargo la falta de consenso en la tasa del grupo nos ha llevado a utilizar más de una calibración para estimar los tiempos de divergencia (tabla 8).

**Tabla 8.** Estimación de los tiempos de divergencia para las especies hermanas del Pacífico-Este de los géneros *Trachurus* (*T. murphyi* – *T. symmetricus*), *Engraulis* (*E. ringens* – *E. mordax*) y *Sardinops* (*S. sagax* – *S. caeruleus*). Se muestran los tiempos de divergencia encontrados en millón de años con las dos aproximaciones empleadas: coalescencia y construcción filogenética por Máxima Verosimilitud (ML), por este último método no fue posible realizar estimaciones de divergencia para *Sardinops* con Cyt b, por no encontrarse un nodo claro de escisión entre los haplotipos de cada especie.

Género	Región Control, tiempo de divergencia en Millón de años atrás (MYA)			
	Tasa 3,6%		Tasa 8%	
	Coalescencia	ML	Coalescencia	ML
<i>Trachurus</i>	0.29	0.36	0.13	0.16
<i>Engraulis</i>	2.35	3.79	1.05	1.71
<i>Sardinops</i>	0.33	---	0.14	---
Género	Citocromo b, tiempo de divergencia en Millón de años atrás (MYA)			
	Tasa 0,15 %		Tasa 2% / 1%	
	Coalescencia	ML	Coalescencia	ML
<i>Trachurus</i>	3.00	3.09	0.22 / 0.45	0.23 / 0.46
<i>Engraulis</i>	49.45	143.49	3.71 / 7.42	10.76 / 21.52
<i>Sardinops</i>	1.75	---	0.13 / 0.26	---

Aplicando una tasa de calibración del reloj molecular de 3,6%, estimada a partir de RC de especies del género *Centropomus* (Donaldson & Wilson, 1999), se obtiene que la fecha de divergencia de *T. murphyi* y *T. symmetricus* es 0.29 MYA, y para *S. sagax* y *S. caeruleus* es 0.33 MYA. Aplicando la misma calibración para las especies *E. ringens* y *E. mordax* la fecha de divergencia es 2.3 MYA. Si estimamos la divergencia con una tasa menos conservativa (i.e., 8 % - 11% obtenida a partir de RC de una especie de esturión (*Acipenser transmontanus*) (Brown y col., 1993) los tiempos de divergencia disminuyen a 0.13 MYA para las especies del género *Trachurus*, 0.14 para las del género *Sardinops* y a 1.05 MYA para las especies hermanas del género *Engraulis*. Si estimamos las divergencias entre las especies para la RC a partir de las distancias obtenidas por la aproximación de ML (las distancias

ahora incluirían un modelo de sustitución nucleotídica) las fechas de divergencia son muy similares a las descritas anteriormente.

A partir de los resultados de divergencia obtenidos del Cyt b de las especies en cuestión, podemos nuevamente estimar la fecha de divergencia transecuatorial en el Pacífico-Este de los tres géneros. Una de las tasas mas bajas de calibración del reloj molecular para Cyt b en peces, encontrada en la literatura es de 0,15%, obtenidas a partir de calibración fósil del género *Trachurus* (ver Cárdenas y col. 2005) y reportada en forma anterior por Cantatore y col., 1994 para perciformes. La aplicación de esta tasa a los tiempos de coalescencia de nuestros datos nos entrega tiempos de divergencia de 3.00 MY para las especies *T. murphyi* – *T. symmetricus*, 1.75 MY para *S. sagax* – *S. caeruleus* y esta fecha aumenta considerablemente para *E. ringens* – *E. mordax* alcanzando 49.45 MY. Las tasas de calibración del reloj molecular para genes codificantes del mtDNA que más recurrentemente se encuentran en la literatura son de 1 a 2 %, estimadas entre otros por Brown y col. 1979 (obtenida por estimación en primates); Johns & Avise 1998; Tringali y col., 1999 (estimaciones obtenidas a partir de 3 pares de peces del genero *Centropomus*); Bermingham, 1997 (utilizando peces teleósteos), lo que nos entrega fechas de divergencia de 0.22 – 0.45 MAY para *T. murphyi* – *T. symmetricus*, 0.26 – 0.13 para *S. sagax* – *S. caeruleus* y 3.71 - 7.42 para *E. ringens* – *E. mordax*. La estimación de fechas de divergencia para este gen a partir de las topologías obtenidas por ML son muy similares para las especies del género *Trachurus* (tabla 8), sin embargo los cálculos de divergencia aumentan enormemente para las especies del género *Engraulis*, pasando de estimaciones de 3.71 - 49.41 MYA por coalescencia, a 10.76 – 143.49 por estimación a partir de ML.

Los resultados encontrados, con tres estimaciones de tasas de sustitución y dos genes, muestran que la distribución antitropical del Pacífico–Oriental en los géneros *Trachurus* y *Sardinops* presentan tiempo de divergencia similares, reflejando una separación en el Pleistoceno hace menos de medio millón de años. Así, probablemente estas especies presentaron flujo génico durante la Glaciación de Riss/Illinois. La excepción se encuentra en la aplicación de una de las tasas mas bajas descrita en la literatura (0.15%) para Cyt b, que aunque permite relacionar la divergencia de estas especies con la formación del Istmo de Panamá, nos obliga a preguntarnos ¿cual sería la tasa de sustitución que tendría la RC para que transcurrido este tiempo de separación presente la divergencia observada? La respuesta es una tasa extremadamente baja (aproximadamente 0.3% para ambos pares de especies), muy inferior a lo descrito para esta región en la literatura.

Los resultados de divergencia encontrados para las especies del género *Trachurus*, concuerdan con el período geológico de divergencia registrado en la literatura. Stepien y Rosenblatt en 1996 usando aloenzimas, reportaron que la separación habría ocurrido hace 0.228 - 0.076 MYA, estos resultados apuntan a una divergencia durante el Pleistoceno. El rango encontrado en esta tesis, es un poco mas antiguo, desplazando la divergencia a 0.46 – 0.22 MYA.

Por su parte, los tiempos de divergencia encontrados para las especies de los géneros *Sardinops* son también concordantes con la literatura sobre el tema, estudios de aloenzimas, RC y Cyt b registraron divergencias entre 1 – 0.2 MYA, los resultados de esta tesis permiten acortar el rango entre 0.33 – 0.13 MYA.

Las especies del género *Engraulis*, mostraron una divergencia mucho mayor. Se descartó la tasa de 0.15% para RC por el mismo motivo explicado anteriormente y

además por que ciertas características de las especies de este género, como corto tiempo generacional, poblaciones extremadamente grandes, pequeño tamaño corporal, se han correlacionado con un rápido reloj molecular. La tabla 8 muestra un rango de divergencia encontrado, que va desde 21.5 a 1 MYA. La divergencia de estas especies se enmarca en las épocas geológicas del Plioceno - Mioceno, abarcando eventos como la emergencia del Istmo de Panamá, la formación de NADW (Wright & Miller, 1996), la glaciación del oeste de Antártica y generación de la Corriente Circumpolar Antártica y Corriente de Humboldt, en sus formas actuales (Hinojosa & Villagrán, 1997).

El único trabajo sobre la divergencia de estas especies encontrado en la literatura (Grant y col. 2005), es a partir de aloenzimas y Cyt b, reportando fechas de divergencias durante el Mioceno (23 a 10.7 MYA), estos resultados son completamente concordantes con lo encontrado en este trabajo con Cyt b.

Las diferencias en los tiempos estimados para los tres pares de especies hermanas y el gran rango de fechas de divergencias obtenidos nos lleva a preguntarnos si es correcto calcular los tiempos de divergencia entre los tres pares de especies estudiados con una misma tasa o si esta variará entre especies no hermanas. Filogenéticamente, sardinas y anchovetas son más cercanas, pues pertenecen al mismo orden (*Clupeiformes*) y presentan muchas características comunes: grandes tamaños poblacionales, especies de vida corta (longevidad entre 3 y 4 años), , alta incidencia de mortalidad natural, tiempo generacional equivalente, estrategias reproductivas similares (desoves múltiples y similares periodos de desove y reclutamiento), hábitat caracterizados por sistemas de surgencia y similares profundidades (Cubillos y col., 2001, 2002). Ambas especies se diferencian con las

especies del género *Trachurus* en que estas últimas presentan tiempos generacionales más largos y alcanzan dentro de su hábitad mayor profundidad, que según la literatura discutida, significaría una tasa mutacional mayor para sardinas y anchovetas que para jurel. Esto podría explicar las diferencias en las distancias genéticas encontradas entre las especies de los géneros *Engraulis* y *Trachurus*, pero no explica las diferencias entre los géneros *Sardinops* y *Engraulis*.

Otro punto importante de discutir es la diversidad genética observada a nivel de especie, pues advertimos enorme similitud de estos parámetros a nivel intra-género, y diferencias entre géneros. Tratar de entender este patrón observado nos podría dar luces de las causas de las diferencias en los tiempos de divergencia encontrados. Si nos centramos en los resultados encontrados para la RC, las especies de los géneros *Trachurus* muestran una red de haplotipos en forma de estrella, con un haplotipo de mayor frecuencia en la población (anexo Fig. 28, 29), valores de diversidad haplotípica ( $h$ ) bajos ( $h < 0.7$ ) y diversidad nucleotídica pequeña ( $\pi \leq 0,1\%$ ), con un número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) cercano a 1, lo que sería reflejo de poblaciones que han pasado por “cuellos de botella” severos muy recientemente, y un crecimiento poblacional a partir del haplotipo que persistió en la población (Grant & Bowen, 1998). Al estimar cuando ocurrió este fin de cuello de botella o crecimiento poblacional a través un modelo de crecimiento instantáneo y la “Mismatch distribution” (anexo, Fig. 34, gráfica del número de diferencias entre pares de secuencias versus su frecuencia) (Rogers & Harpending, 1992), detectamos la señal de crecimiento hace aproximadamente 0.02 MYA, mucho después de la separación de ambas especies.



Las especies estudiadas del género *Engraulis* por su parte presentan una red similar a estrella, pero con más de un haplotipo dominante, valores de  $h$  altos  $\leq 0.99$ , pero  $\pi$  pequeño ( $\pi \leq 0.9\%$ ), con un  $\Pi \leq 9$  (anexo Fig. 30, 31). Esta combinación de parámetros son atribuidos a poblaciones que han pasado por “cuellos de botella” seguido de rápido crecimiento poblacional y acumulación de mutaciones (Grant & Bowen, 1998). Al estimar cuando ocurrió este crecimiento a través de un modelo de crecimiento instantáneo y la “Mismatch distribution” (anexo, Fig. 34) (Rogers & Harpending, 1992), encontramos que la fecha es muy similar a la observada para *Trachurus*, alrededor de 0,05 MYA. Esta fecha de crecimiento podría reflejar el fin de un único cambio ambiental de gran escala, que afectó las 4 especies de los dos géneros y la diferencia en fecha encontrada, sería simplemente reflejo de crecimientos poblacionales, seguidos al cuello de botella, a partir de diversidades haplotípicas distintas.

El modelo que explicarían la evolución de las poblaciones de júreles y anchovetas se muestra en la figura 27a. Este patrón se observa de manera concordante no solo entre las especies del mismo género (*T. murphyi* – *T. symmetricus*, *E. ringens* – *E. mordax*) sino que además refleja un proceso de extinción-recolonización similar en ambos géneros.

Las especies estudiadas del género *Sardinops* reflejan en sus diversidades genéticas por especie, una historia evolutiva completamente distinta a los otros dos géneros estudiados. Estas especies muestran una red de haplotipos muy extendida (anexo Fig. 32, 33),  $h$  grandes ( $h = 0.99$ ) y diversidades nucleotídicas también altas ( $\pi > 1,7\%$ ), con un número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) cercano a 20, que representa a poblaciones grandes y estables, con una larga historia

evolutiva (Grant & Bowen, 1998). Este patrón se observa en ambas especies de sardinas y permite proponer el modelo de evolución de la figura 27b.

Los dos diferentes modelos de evolución propuestos, nos muestran que los tres géneros estarían respondiendo a cambios ambientales severos en forma distinta y a partir de diferentes tamaños efectivos. Producto de la susceptibilidad de las especies de *Trachurus* y *Engraulis* a los cambios ambientales estas especies pierden su diversidad genética fruto de uno o más cuellos de botella. Las especies del género *Sardinops* en cambio, parecen no verse afectadas por estos cambios ambientales y concordantemente, a partir de un modelo de crecimiento instantáneo (Rogers & Harpending, 1992) y la "Mismatch distribution" (anexo, Fig. 34), encontramos la última señal de cuello de botella hace mucho más tiempo a lo encontrado en los otros dos géneros, hace 0.25 MYA. Esto nos lleva a postular que las especies del género *Sardinops*, posterior a su separación, a partir de haplotipos muy cercanos han sufrido un gran crecimiento poblacional sin reducciones severas en sus tamaños, lo cual se reflejaría en la baja distancia genética encontrada entre las especies. Si estas poblaciones, con un gran número de haplotipos, redujeran drásticamente sus tamaños por un cuello de botella severo, solo algunos haplotipos permanecerían en la población y observaríamos una mayor distancia genética entre estas especies (como lo observado en el caso de las especies del género *Trachurus*).

Por último, las reconstrucciones filogenéticas realizadas con RC y Cyt b, no lograron separar dos linajes evolutivos entre las especies *Sardinops sagax* y *Sardinops caeruleus*, lo cual se ve reflejado en que (1) las distancias acumuladas entre taxa ( $\Pi$ Inter RC = 26.87,  $\Pi$ Inter Cyt b = 2.11) son muy similares a las distancias entre haplotipos de una misma especie (RC  $\Pi$  *S. sagax* = 19.46; RC  $\Pi$  *S.*

---

*caeruleus* = 23.14; Cyt b *S. sagax*  $\Pi$  = 1.87; Cyt b *S. caeruleus*  $\Pi$  = 1.77) , (2) se encontraron bajos valor de Fst (0.27 RC; 0.14 Cyt b), por lo que se recomienda para estos taxa la categoría taxonómica de sub-especie: *Sardinops sagax sagax* y *Sardinops sagax caeruleus*.

## 6.- CONCLUSIONES

1. La Distribución Antitropical en el Pacífico Oriental de las especies de los géneros *Trachurus* (*T. murphyi* - *T. symmetricus*) género *Engraulis* (*E. ringens* - *E. mordax*) y género *Sardinops* (*S. sagax* - *S. caeruleus*), NO tendría un origen y cronología común, lo que indicaría que fue ocasionada por eventos climáticos y/o oceanográficos distintos.
2. Las especies de los géneros *Trachurus* (*T. murphyi* - *T. symmetricus*) y *Sardinops* (*S. sagax* - *S. caeruleus*), muestran divergencia reciente, durante el Pleistoceno.
3. Las especies del género *Engraulis* (*E. ringens* - *E. mordax*) muestran divergencia durante el Plioceno o Mioceno, abarcando eventos oceanográficos y climáticos tan importantes como la emergencia del Istmo de Panamá, la formación de NADW, la intensificación de la circulación termohalina actual, la glaciación del oeste de Antártica y generación de la Corriente Circumpolar Antártica y Corriente de Humboldt, en sus formas actuales.
4. Frente a cambios ambientales de gran escala las especies estudiadas de los géneros *Trachurus* (*T. murphyi* - *T. symmetricus*) se ve mayormente afectado reduciendo drásticamente sus tamaños poblacionales, las especies del género *Engraulis* (*E. ringens* - *E. mordax*) presenta una menor reducción en sus

tamaños poblacionales y poblaciones de *Sardinops* (*S. sagax* - *S. caeruleus*) parecen no verse afectadas.

5. Las especies de un mismo género muestran una historia demográfica análoga en los dos hemisferios, lo que refleja que frente a cambios oceanográficos de gran escala, las especies hermanas estarían respondiendo de manera similar.
  
6. Las reconstrucciones filogenéticas usando dos marcadores (Región Control y Citocromo b), no lograron separar dos linajes evolutivos entre las especies *Sardinops sagax* y *Sardinops caeruleus*, por lo que se recomienda entre ellas la categoría taxonómica de sub-especie: *Sardinops sagax sagax* y *Sardinops sagax caeruleus*.

## FIGURAS

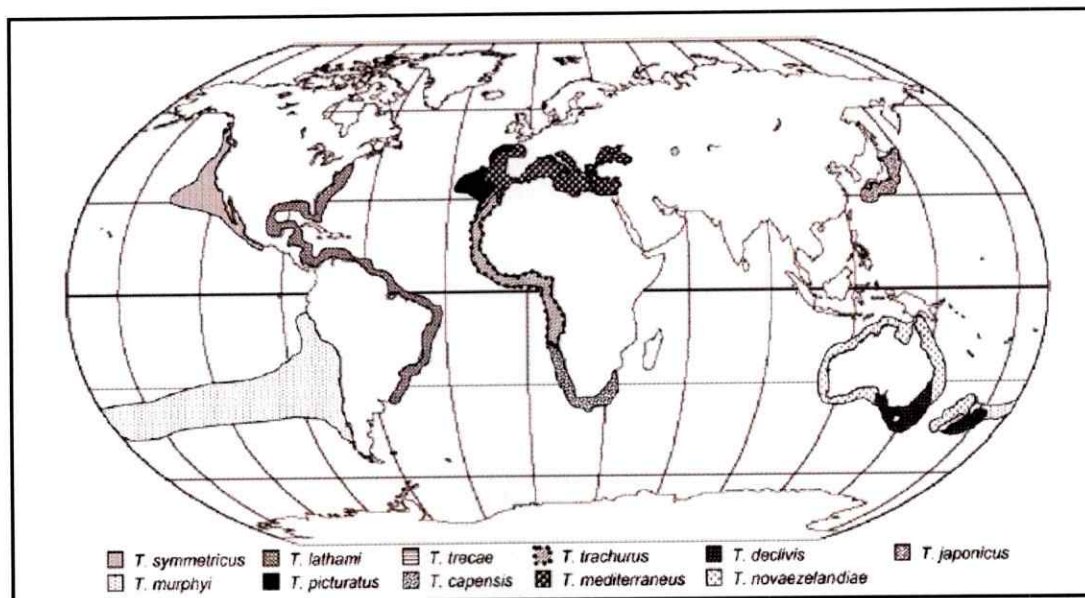


Fig. 1: Mapa de la distribución de 11 especies del género *Trachurus* (Cárdenas y col. 2005).

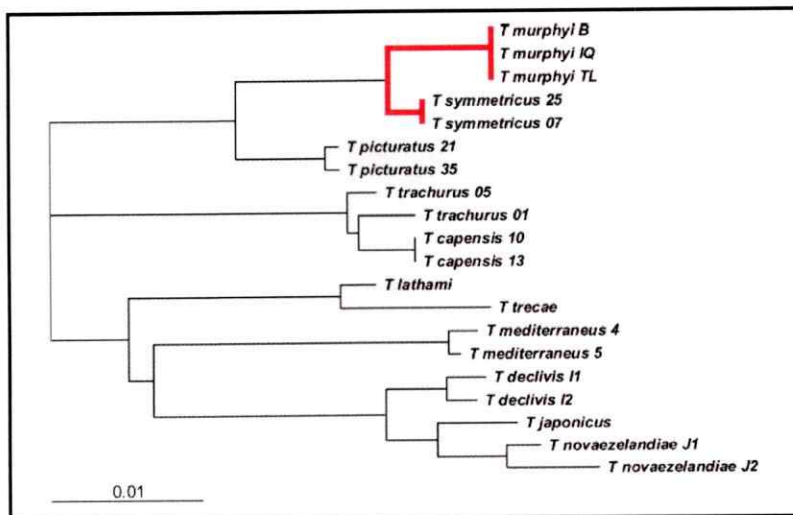


Fig. 2: Cladograma de las relaciones filogenéticas entre 11 especies del género *Trachurus*, basado en secuencias de Cyt b (Cárdenas et al, 2005). El clado destacado en rojo confirma la relación de especies hermanas entre *T. murphyi* y *T. symmetricus*.

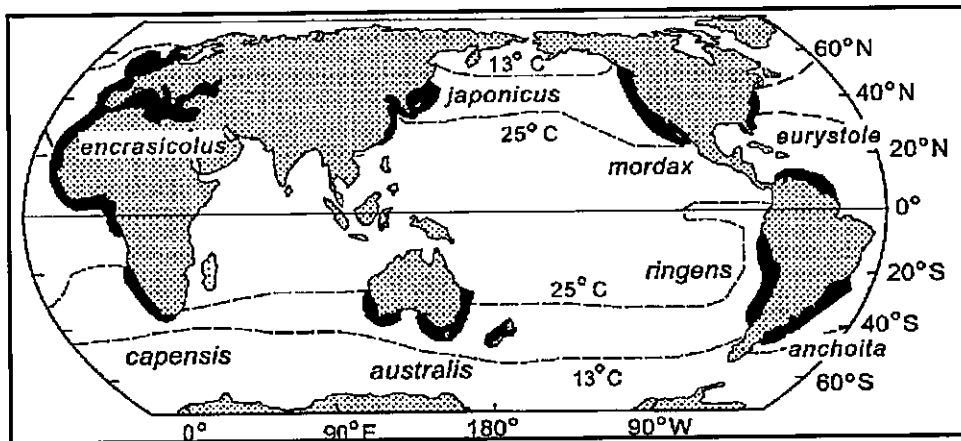


Fig. 3: Mapa de la distribución geográfica de las especies del género *Engraulis*. La línea punteada representa las isotermas de 13° C y 25° C (Grant y Bowen, 1998).

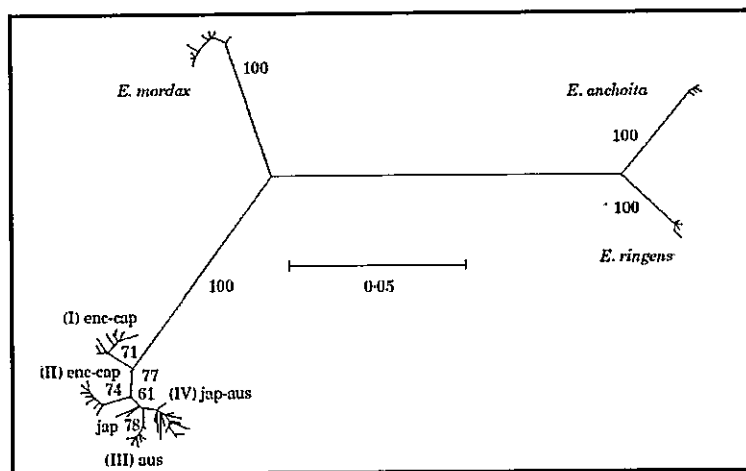


Fig. 4: Relaciones filogenéticas entre las especies del género *Engraulis*. Árbol construido por el método de Vecino más cercano con 521 pb de secuencias de DNA de Cyt b (Grant et al. 2005).

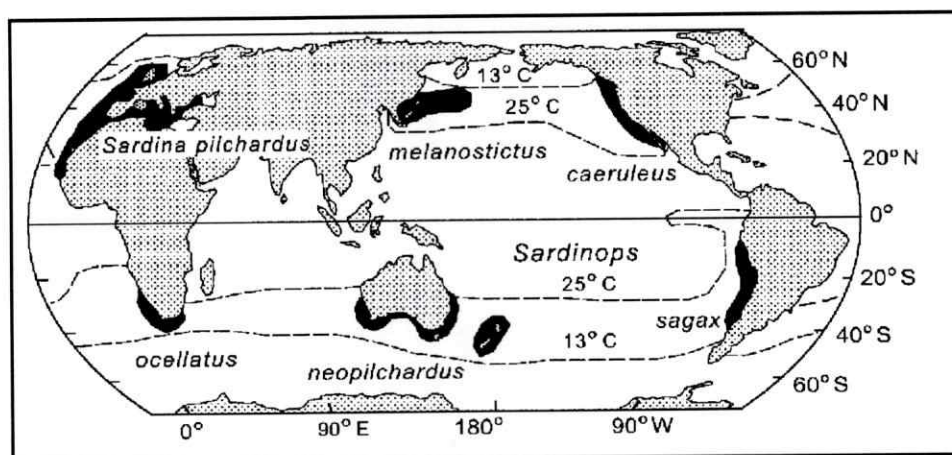


Fig. 5: Mapa de la distribución geográfica de los géneros *Sardina* – *Sardinops*. La línea punteada representa las isotermas de 13° C y 25° C (Grant y Bowen, 1998).

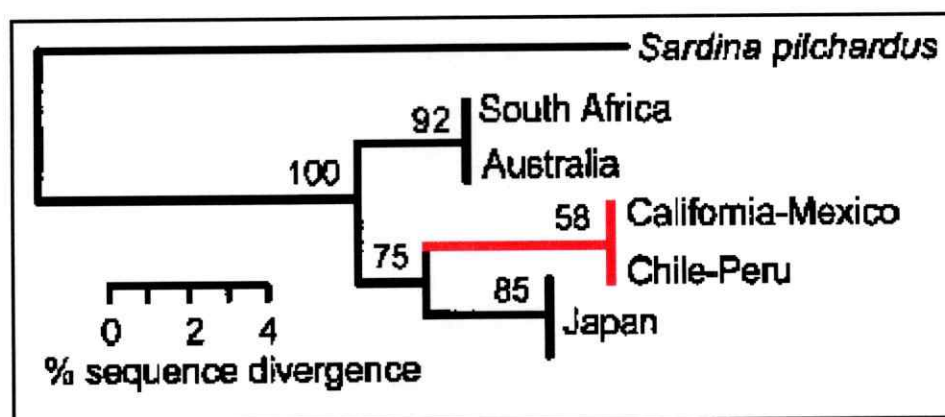
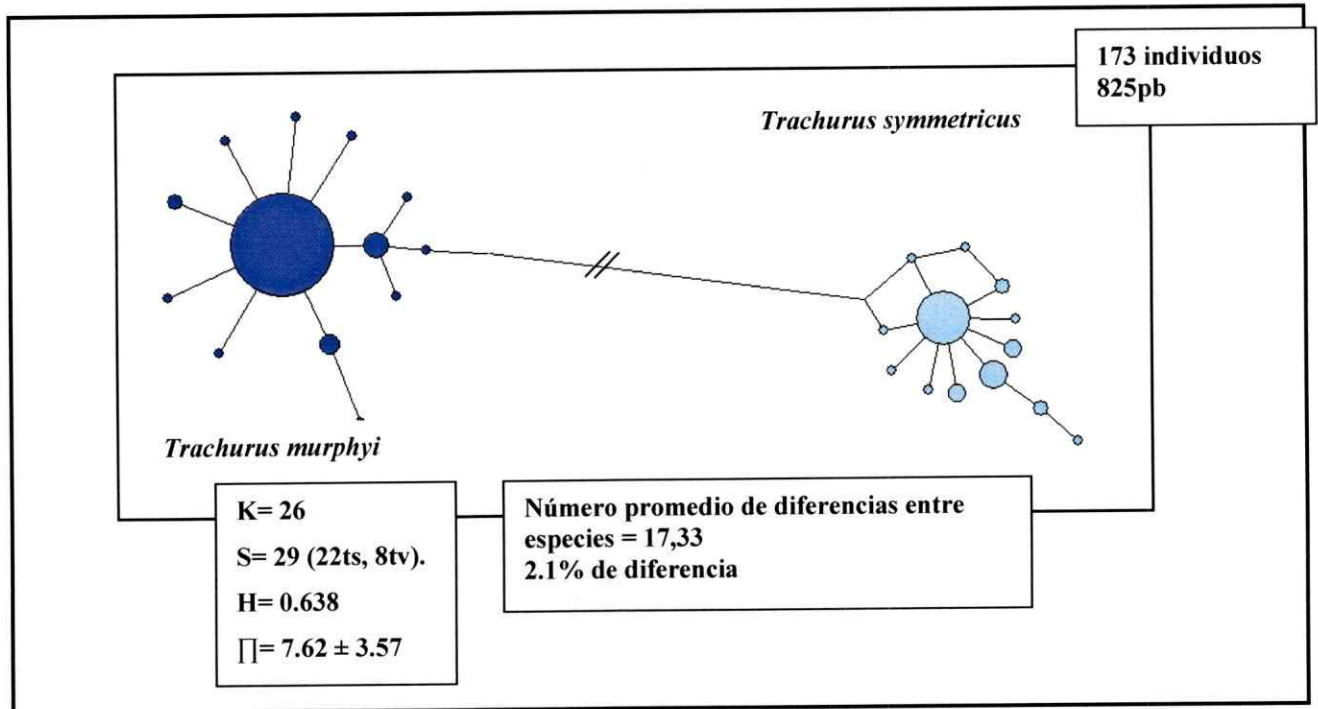
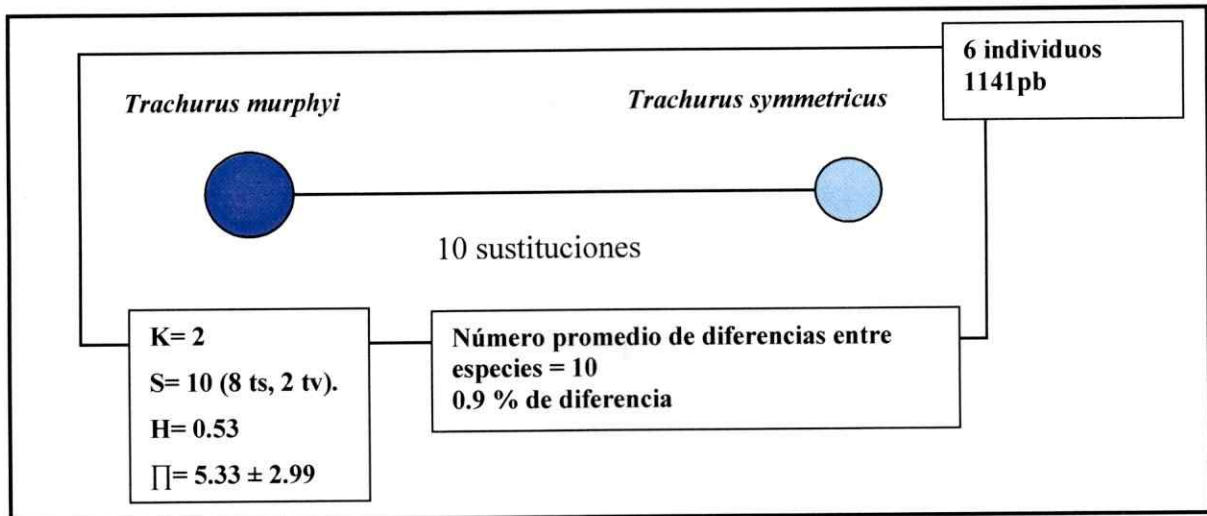


Fig. 6: Relaciones filogenéticas entre los géneros *Sardina* – *Sardinops*. Árbol construido por el método de Vecino más cercano con 220 pb de secuencias de DNA de Cyt b. El clado destacado en rojo confirma la relación de especies hermanas entre *S. sagax* y *S. caeruleus*. Los números representan los valores de bootstrap para cada nodo (Grant y Bowen, 1998).

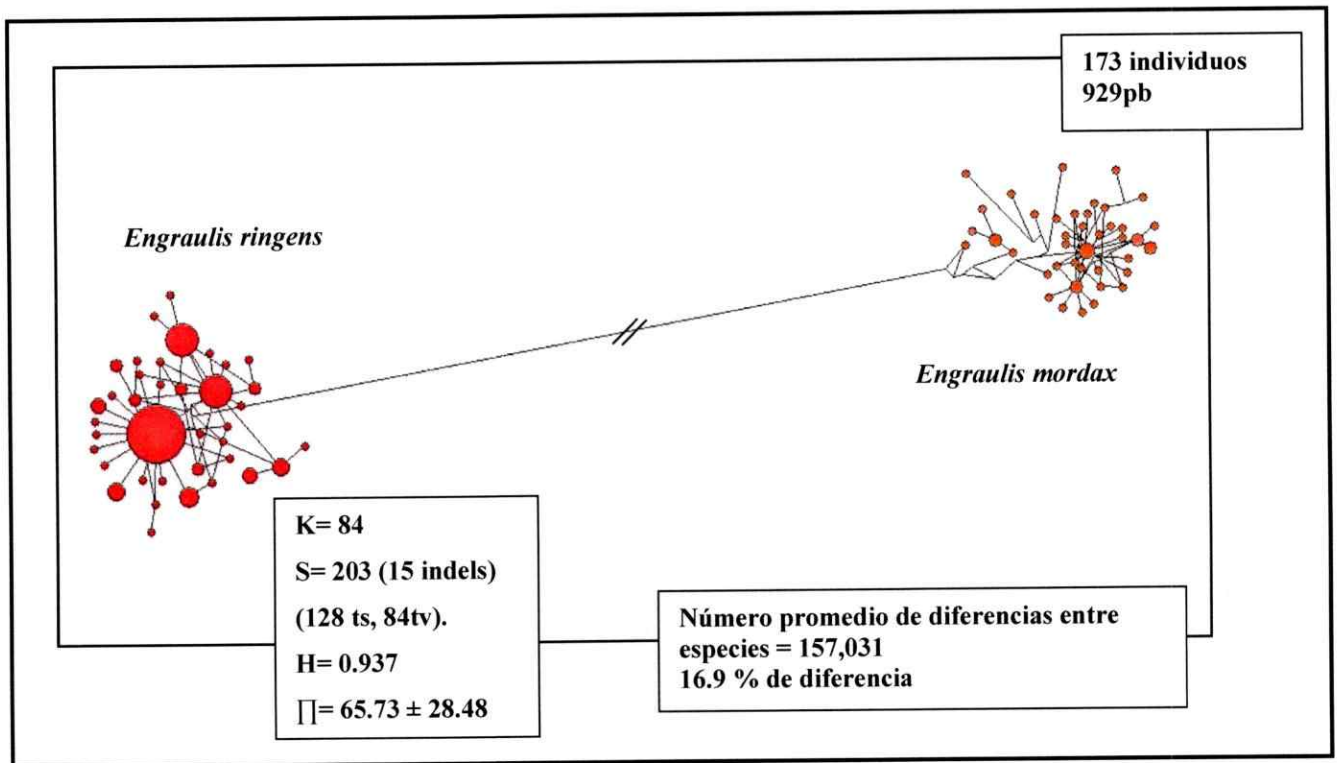




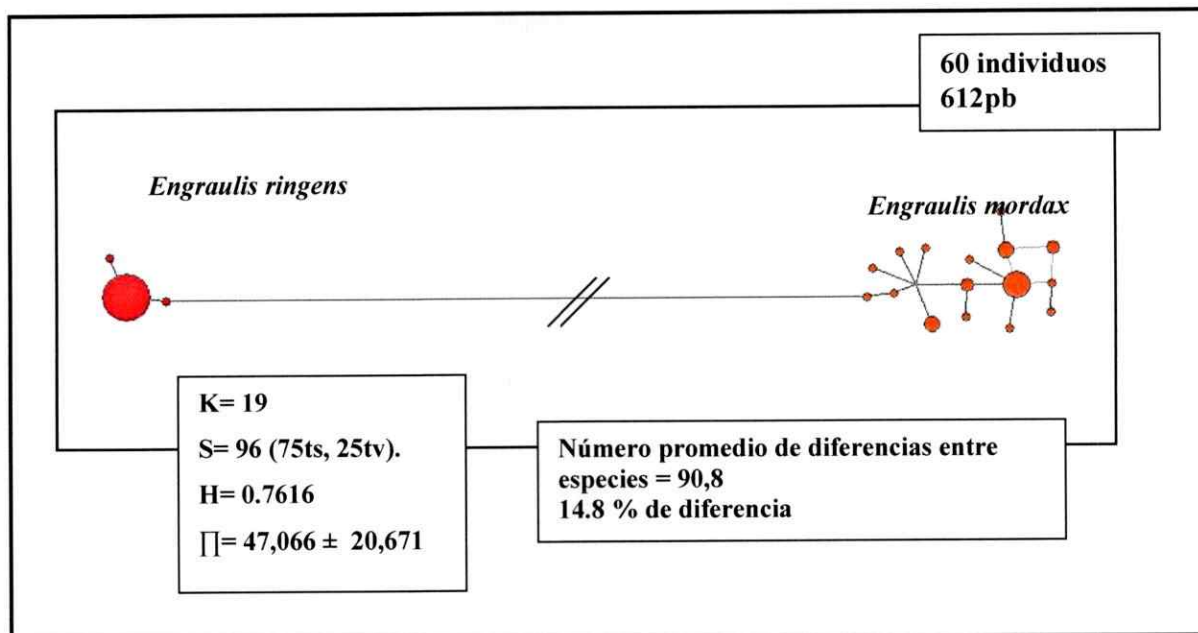
**Fig. 7:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de la RC en *T. murphyi* y *T. symmetricus*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones entre haplotipos. Círculos azules: haplotipos *T. murphyi*, círculos celestes: haplotipos *T. symmetricus*. Se muestran índices de diversidad estándar para ambas especies juntas. Los índices de diversidad genética por especie son: para *T. murphyi* K = 13, S = 12, H = 0.315,  $\Pi$  = 0.4; para *T. symmetricus* K = 13.5, S = 11, H = 0.69,  $\Pi$  = 1.03.



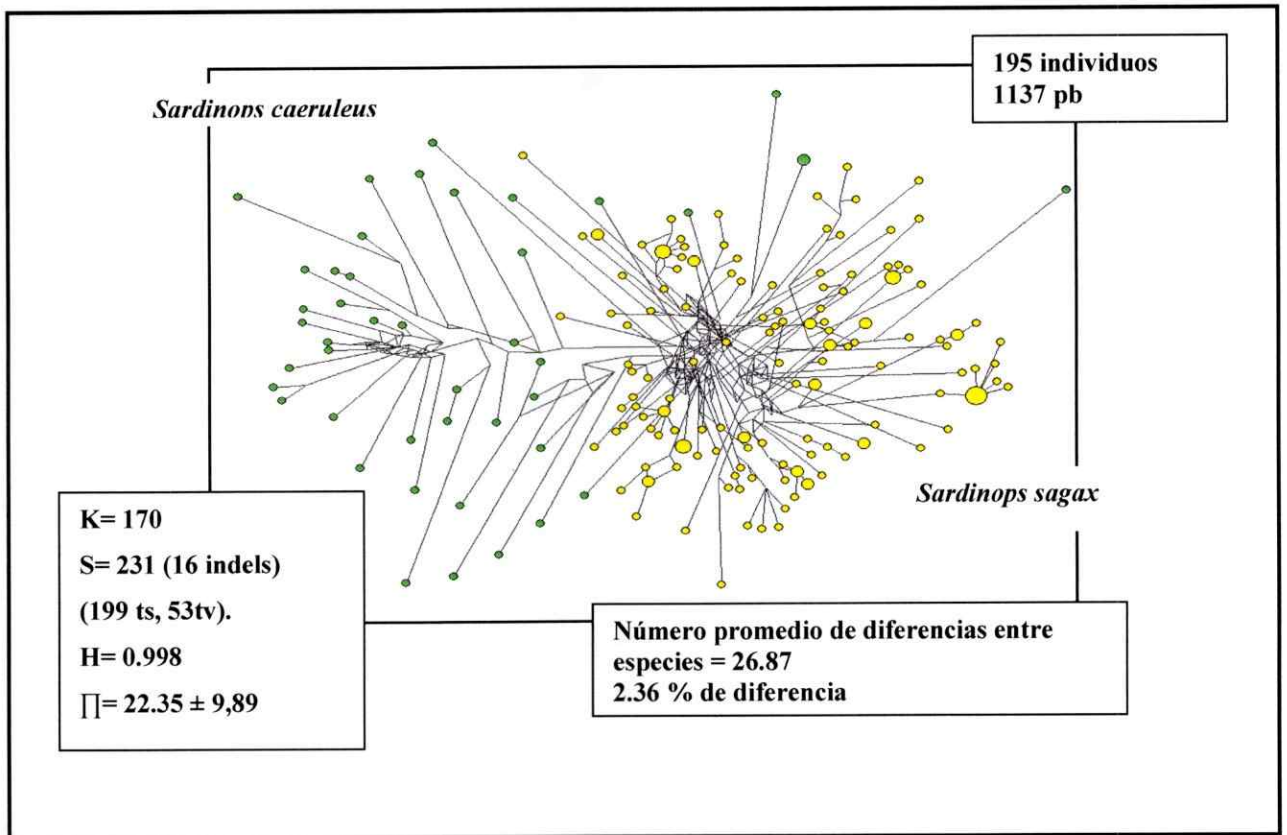
**Fig. 8:** Network filogenético por median-joining de haplotipos del Cyt b en *T. murphyi* y *T. symmetricus*. Cada círculo representa el haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones entre haplotipos. Círculos azules: haplotipo *T. murphyi*, círculos celestes: haplotipo *T. symmetricus*. Se muestran índices de diversidad estándar para ambas especies juntas. Los índices de diversidad genética por especie son: para *T. murphyi*  $K = 1$ ,  $S = 0$ ,  $H = 0$ ,  $\Pi = 0$ ; para *T. symmetricus*  $K = 1$ ,  $S = 0$ ,  $H = 0$ ,  $\Pi = 0$ .



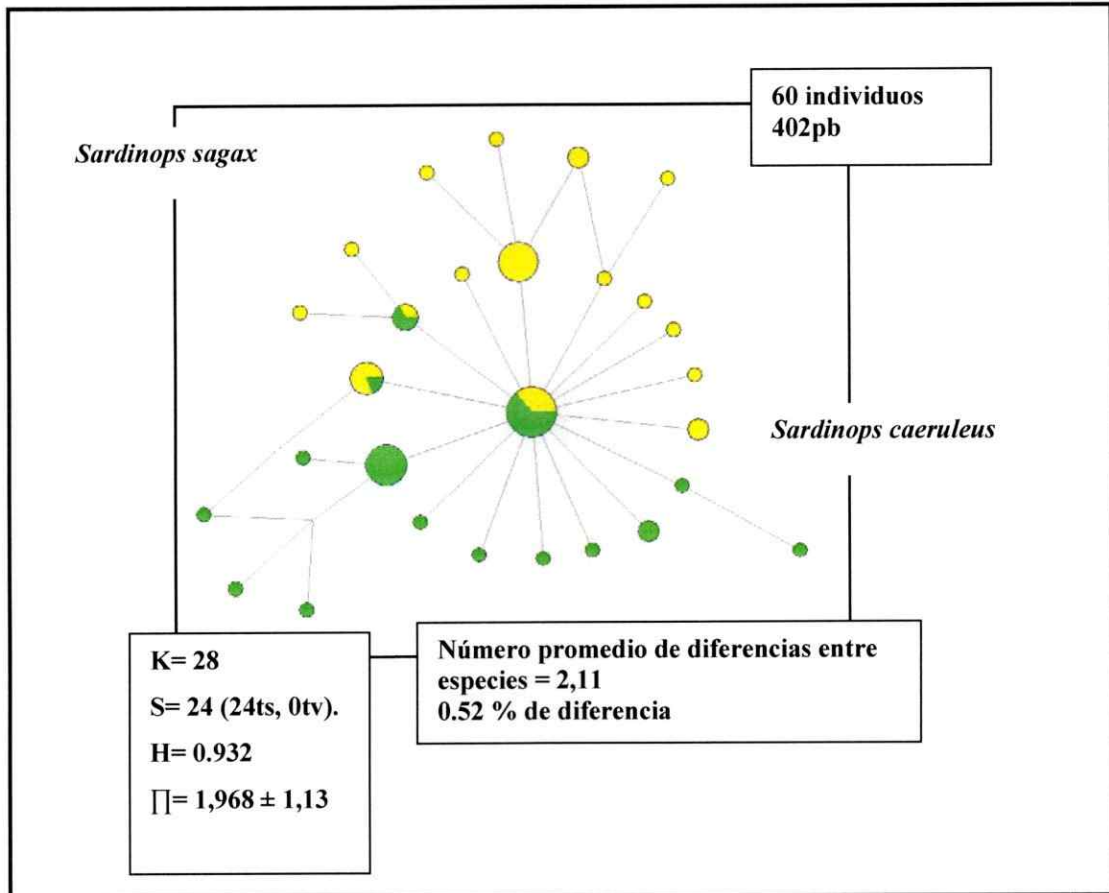
**Fig. 9:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de la RC en *E. ringens* y *E. mordax*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones. Círculos rojos: haplotipos *E. ringens*, círculos naranjos: haplotipos *E. mordax*. Se muestran índices de diversidad estándar para ambas especies juntas. Los índices de diversidad genética por especie son: para *E. ringens*: K = 40, S = 27, H = 0.883,  $\Pi$  = 2.33; para *E. mordax* K = 44, S = 56, H = 0.997,  $\Pi$  = 9.034.



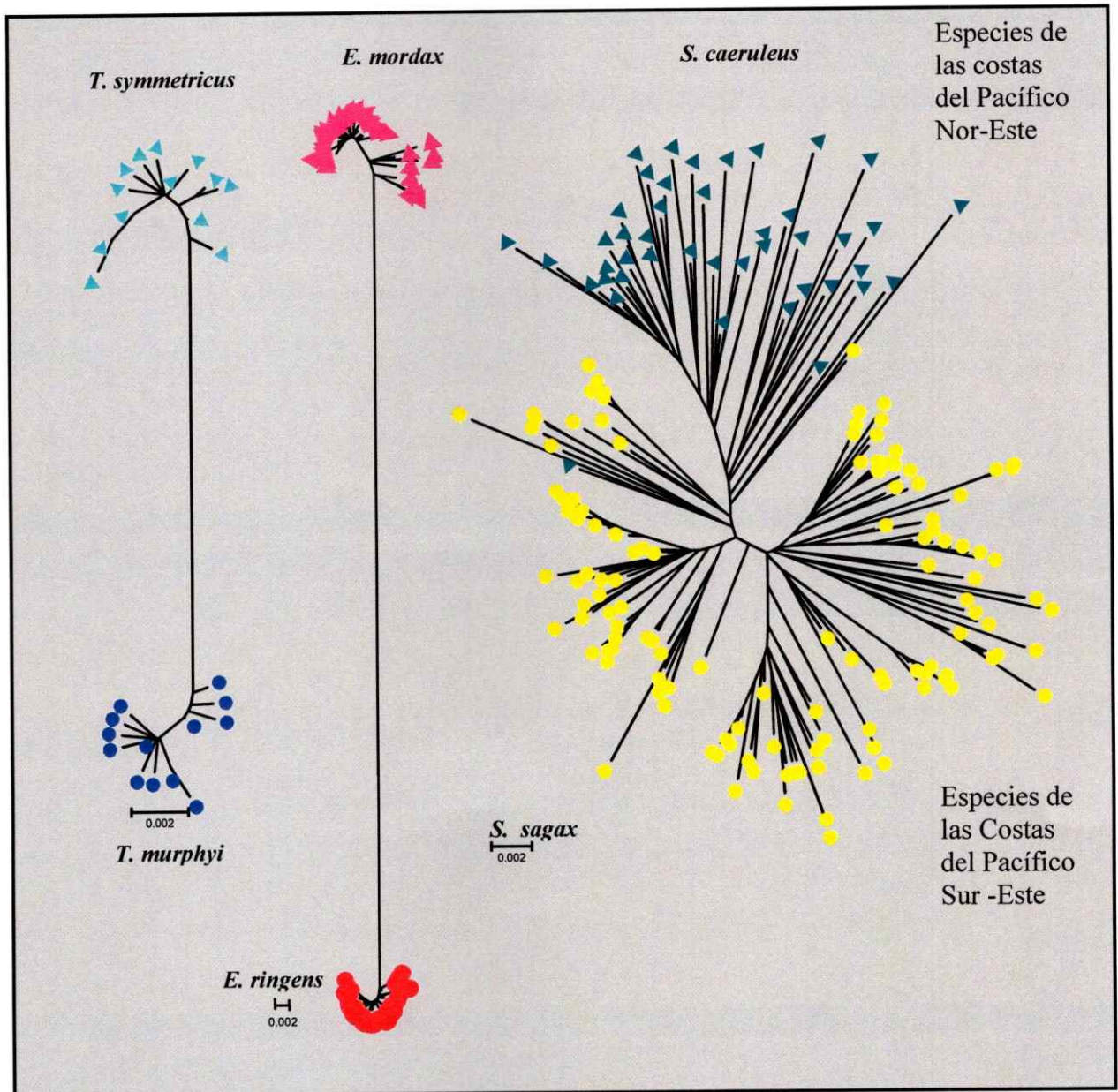
**Fig. 10:** Network filogenético por median-joining de haplotipos del Cyt b en *E. ringens* y *E. mordax*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones. Círculos rojos: haplotipos *E. ringens*, círculos naranjos: haplotipos *E. mordax*. Se muestran índices de diversidad estándar para ambas especies juntas. Los índices de diversidad genética por especie son: para *E. ringens*:  $K = 3$ ,  $S = 2$ ,  $H = 0.131$ ,  $\Pi = 0.133$ ; para *E. mordax*  $K = 16$ ,  $S = 19$ ,  $H = 0.899$ ,  $\Pi = 3.38$ .



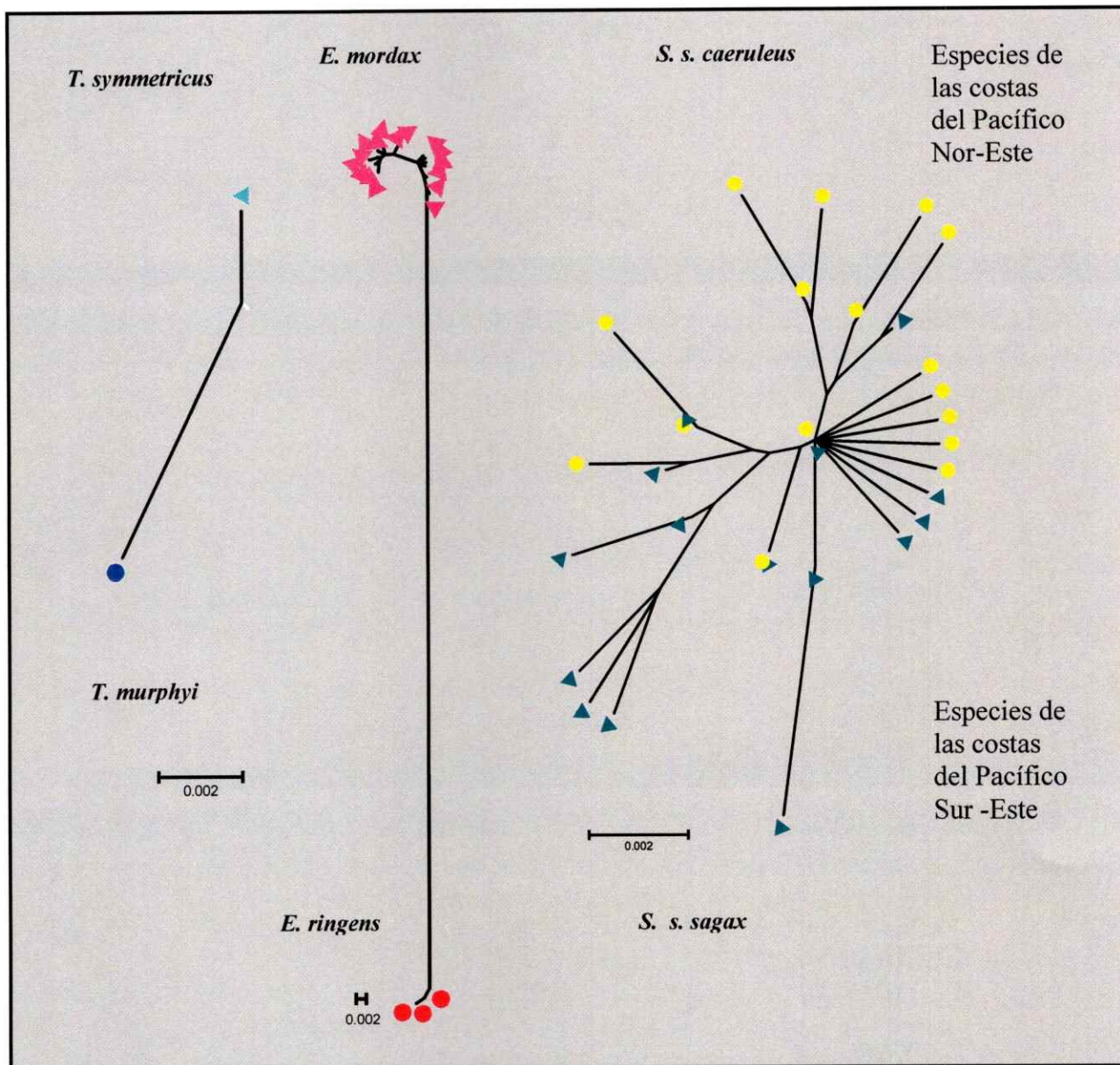
**Fig.11:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de la RC en *S. s. sagax* y *S. s. caeruleus*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones. Círculos amarillos: haplotipos *S. s. sagax*, círculos verde: haplotipos *S. s. caeruleus*. Se muestran índices de diversidad estándar para ambas especies juntas. Los índices de diversidad genética por especie son: para *S. s. sagax*: K = 127, S = 189, H = 0.997,  $\Pi$  = 19.46; para *S. s. caeruleus* K = 43, S = 143, H = 0.999,  $\Pi$  = 23.14.



**Fig. 12:** Network filogenético por median-joining de haplotipos del Cyt b en *S. s. sagax* y *S. s. caeruleus*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones. Círculos amarillos: haplotipos *S. s. sagax*, círculos verdes: haplotipos *S. s. caeruleus*. Se muestran índices de diversidad estándar para ambas especies juntas. Los índices de diversidad genética por especie son: para *S. s. sagax*: K = 16, S = 14, H = 0.920,  $\Pi = 1.87$ ; para *S. s. caeruleus* K = 15, S = 14, H = 0.88,  $\Pi = 1.77$ .

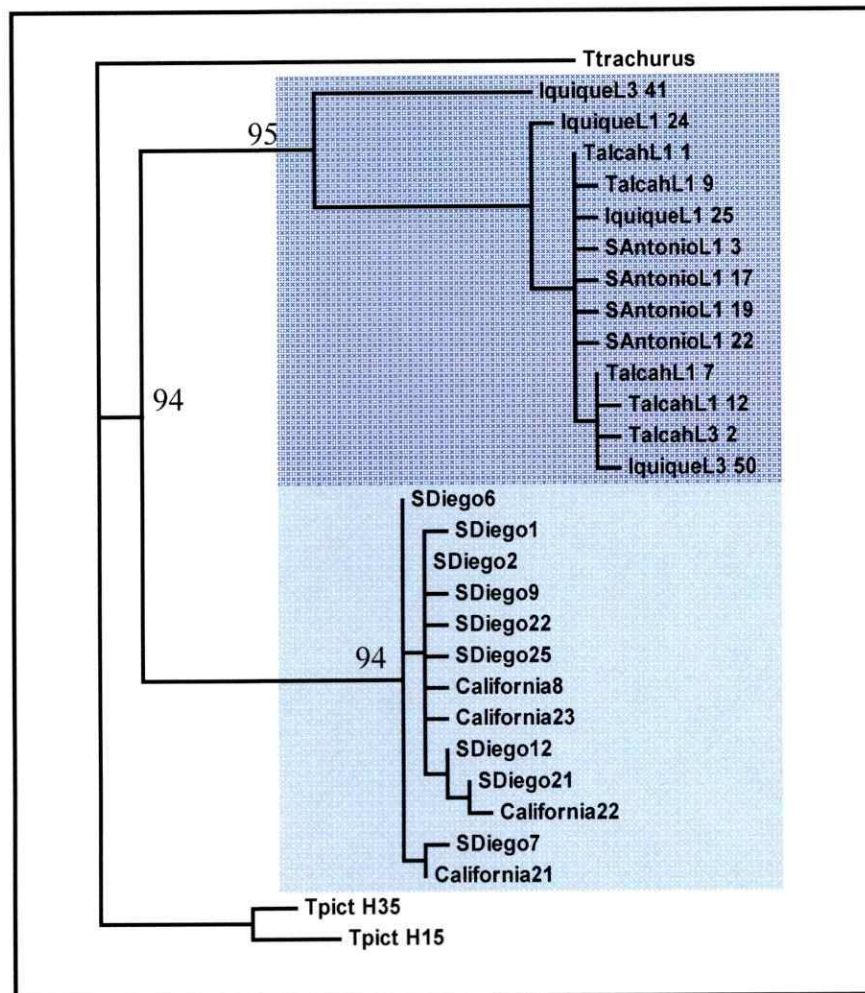


**Fig.13:** Representación de la distancia entre haplotipos de la Región Control de los tres pares de especies estudiadas mediante NJ (árboles sin enraizar), con el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros que incluye transiciones y transversiones. Se muestran en distintos colores las especies. En la parte superior de la figura están las especies que habitan las costas del Pacífico Nor-Este y en la parte inferior las especies que habitan las costas del Pacífico Sur-Este. Las barras muestran las distancias genéticas, cada par de especie aparece graficada con su propia escala.

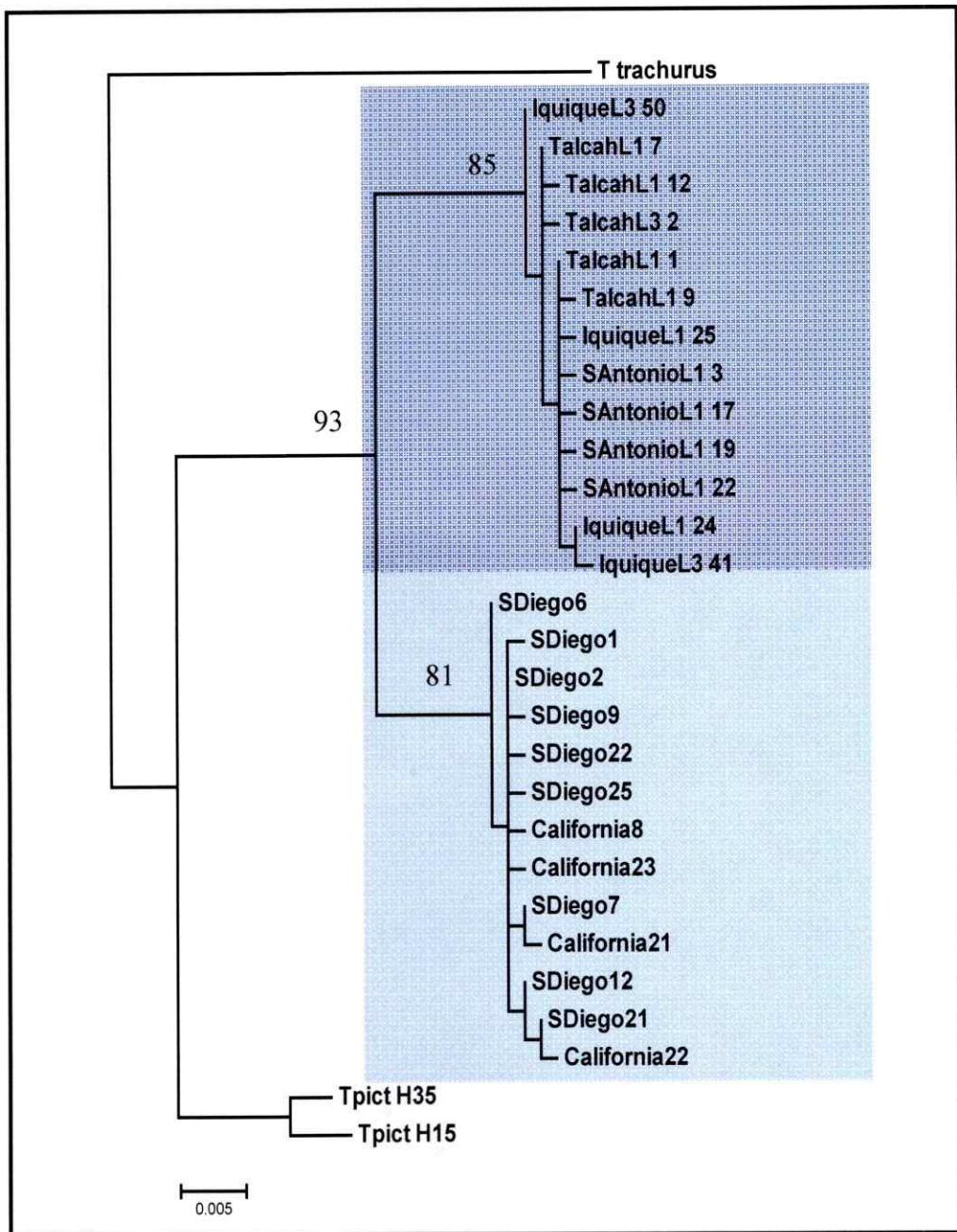


**Fig.14:** Representación de la distancia entre haplotipos de Citocromo b de los tres pares de especies estudiadas mediante NJ (árboles sin enraizar), con el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros que incluye transiciones y transversiones. Se muestran en distintos colores las especies. En la parte superior de la figura están las especies que habitan las costas del Pacífico Nor-Este y en la parte inferior las especies que habitan las costas del Pacífico Sur-Este. Las barras muestran las distancias genéticas, cada par de especie aparece graficada con su propia escala.

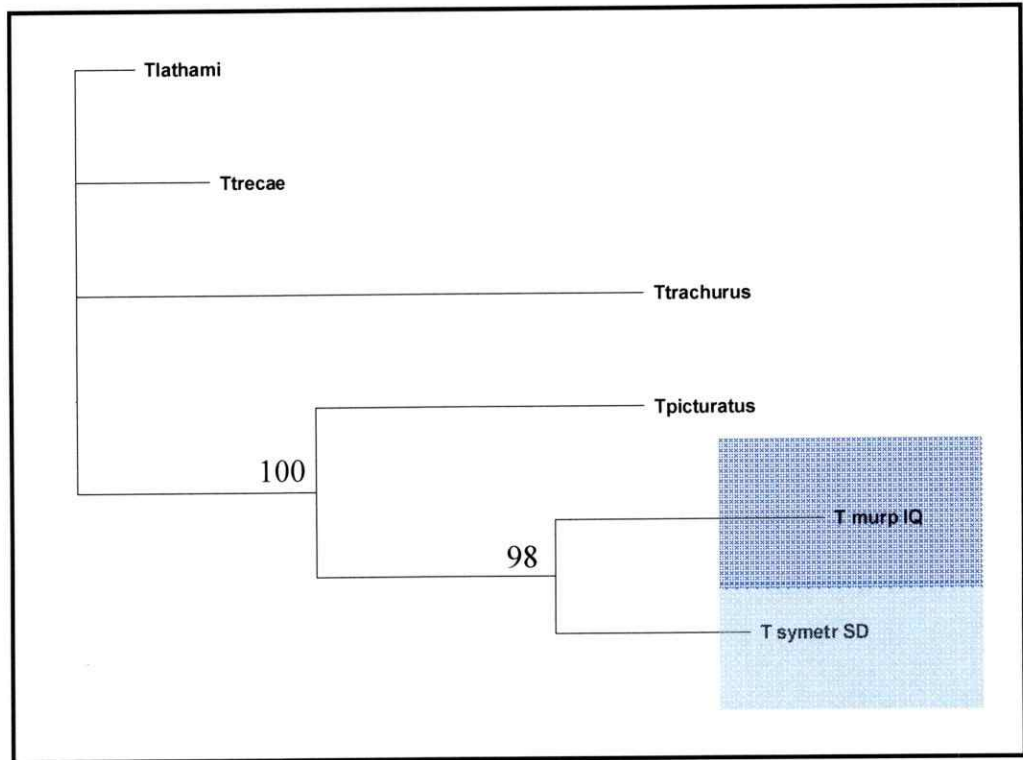




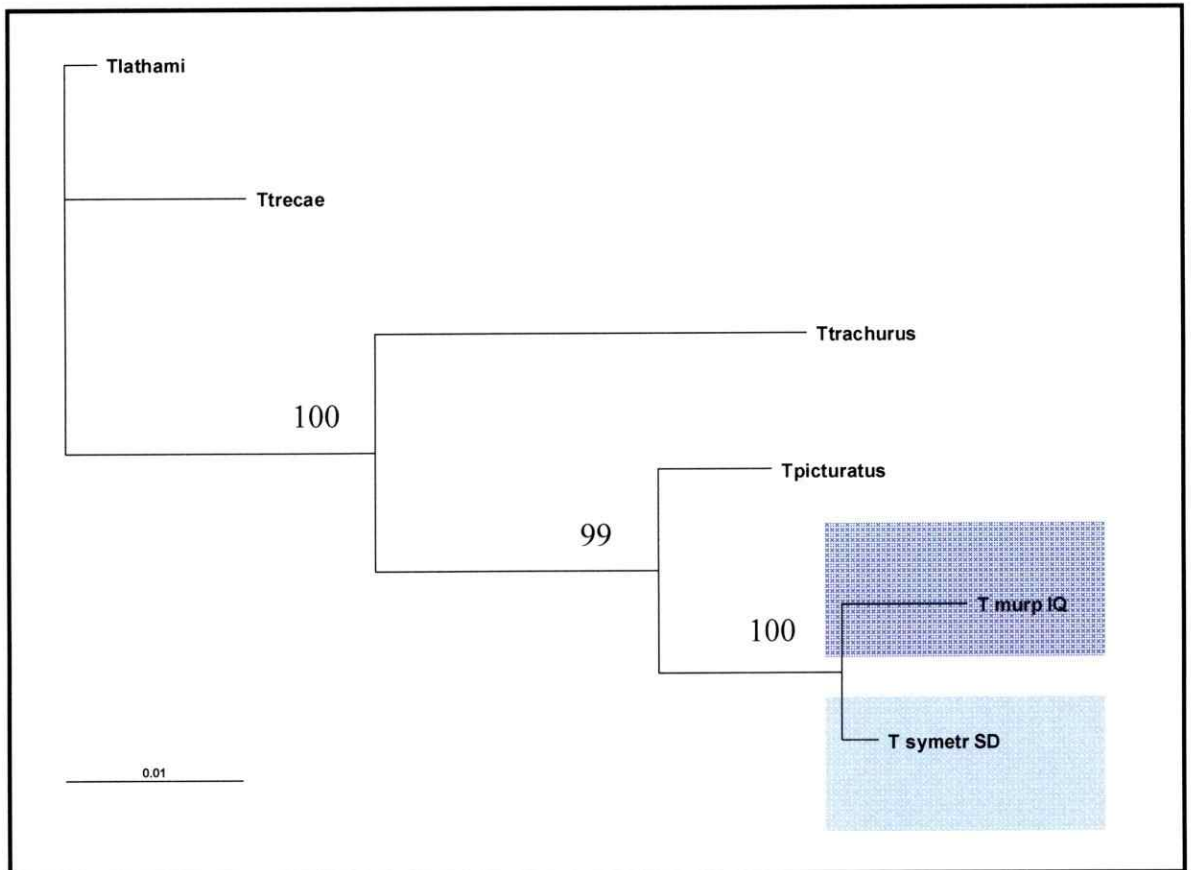
**Fig. 15:** Árbol por MP, basado en secuencias de RC, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Trachurus*, fondo azul muestra haplotipos de *T. murphyi*, fondo celeste haplotipos de *T. symmetricus* (largo del árbol =81, índice de consistencia = 0.81, índice de homoplasia = 0.18). Haplotipos de *T. trachurus* y *T. picturatus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep= 1000) para el análisis.



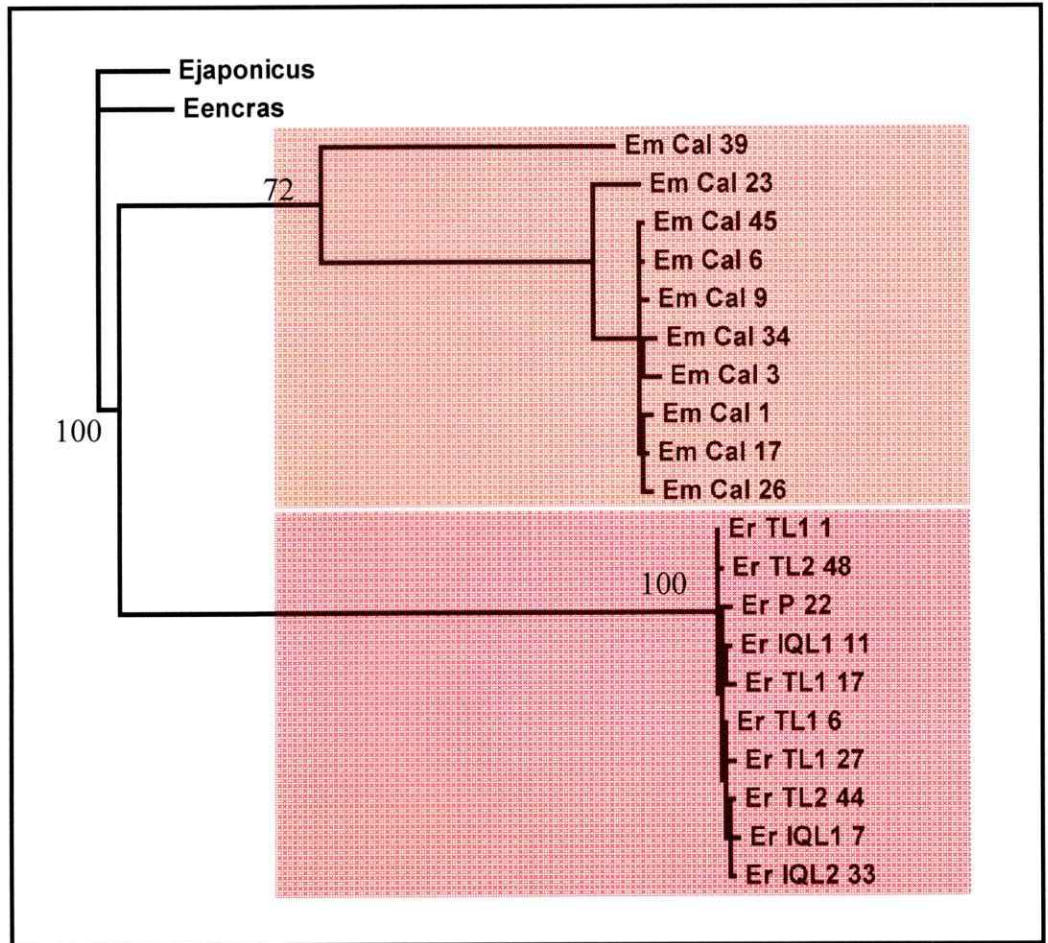
**Fig. 16:** Árbol por ML, basado en secuencias de RC, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Trachurus*, fondo azul muestra haplotipos de *T. murphyi*, fondo celeste haplotipos de *T. symmetricus* (valor de  $-\ln$  likelihood = 1640.76977, modelo de sustitución nucleotídica empleado = TrN+I). Haplotipos de *T. trachurus* y *T. picturatus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep = 1000) para el análisis.



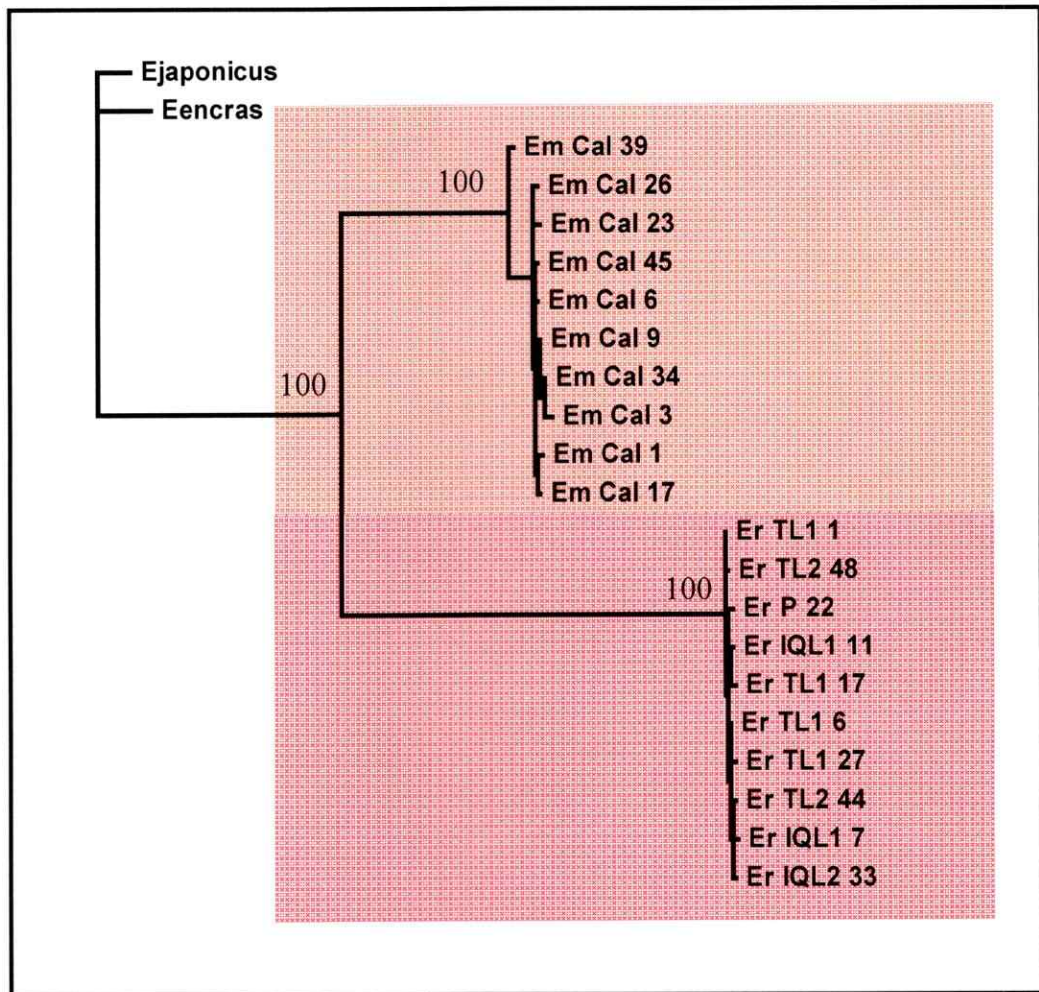
**Fig. 17:** Árbol por MP, basado en secuencias de Cyt b, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Trachurus*, fondo azul muestra haplotipo de *T. murphyi*, fondo celeste haplotipo de *T. symmetricus* (largo del árbol =94, índice de consistencia = 0.91, índice de homoplasia = 0.08). Haplotipo de *T. japonicus* y *T. picturatus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep = 1000) para el análisis.



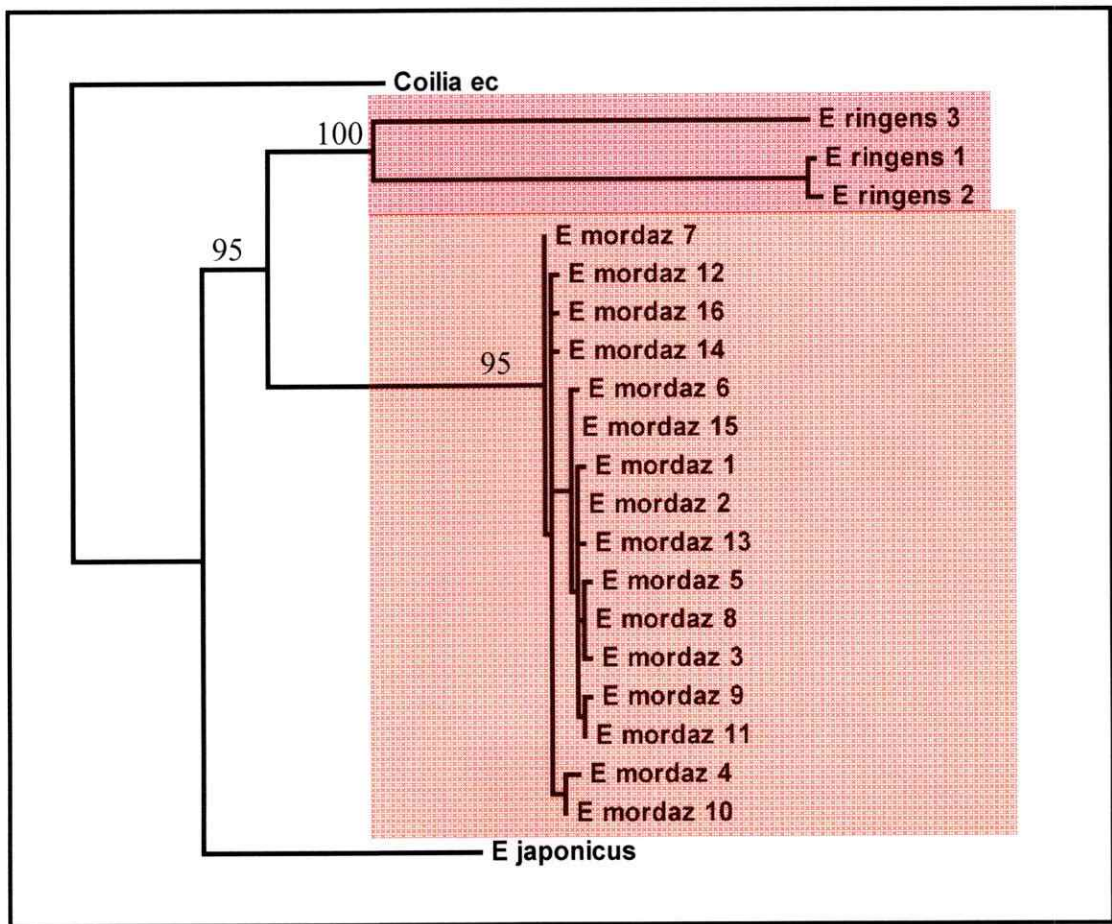
**Fig. 18:** Árbol por ML, basado en secuencias de Cyt b, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Trachurus*, fondo azul muestra haplotipos de *T. murphyi*, fondo celeste haplotipos de *T. symmetricus* (valor de  $-\ln$  likelihood = 2105.84665, modelo de sustitución nucleotídica empleado = TrN+I). Haplotipos de *T. Trachurus*, *T. picturatus*, *T. lathami*, *T. trecae* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep= 1000) para el análisis.



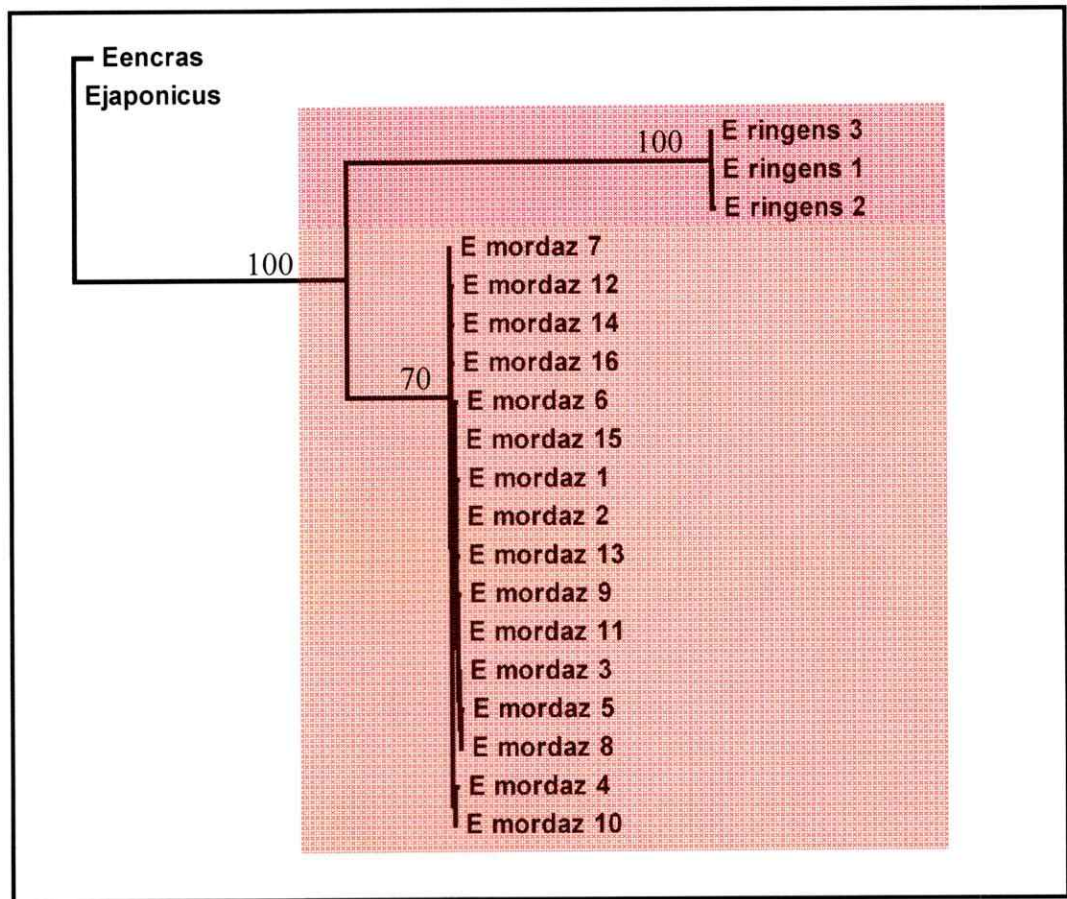
**Fig. 19:** Árbol por MP, basado en secuencias de RC, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Engraulis*, fondo naranja muestra haplotipo de *E. mordax*, fondo rosado haplotipos de *E. ringens* (largo del árbol = 295, índice de consistencia = 0.92, índice de homoplasia = 0.08). Haplotipo de *E. japonicus* y *E. encrasicolus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep= 1000) para el análisis.



**Fig. 20:** Árbol por ML basado en secuencias de RC que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Engraulis*, fondo naranja muestra haplotipos de *E. mordax*, fondo rosado haplotipos de *E. ringens* (valor de  $-\ln$  likelihood = 2711.69188, modelo de sustitución nucleotídica empleado = HKY+G). Haplotipos de *E. japonicus* y *E. encrasicolus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep= 1000) para el análisis.

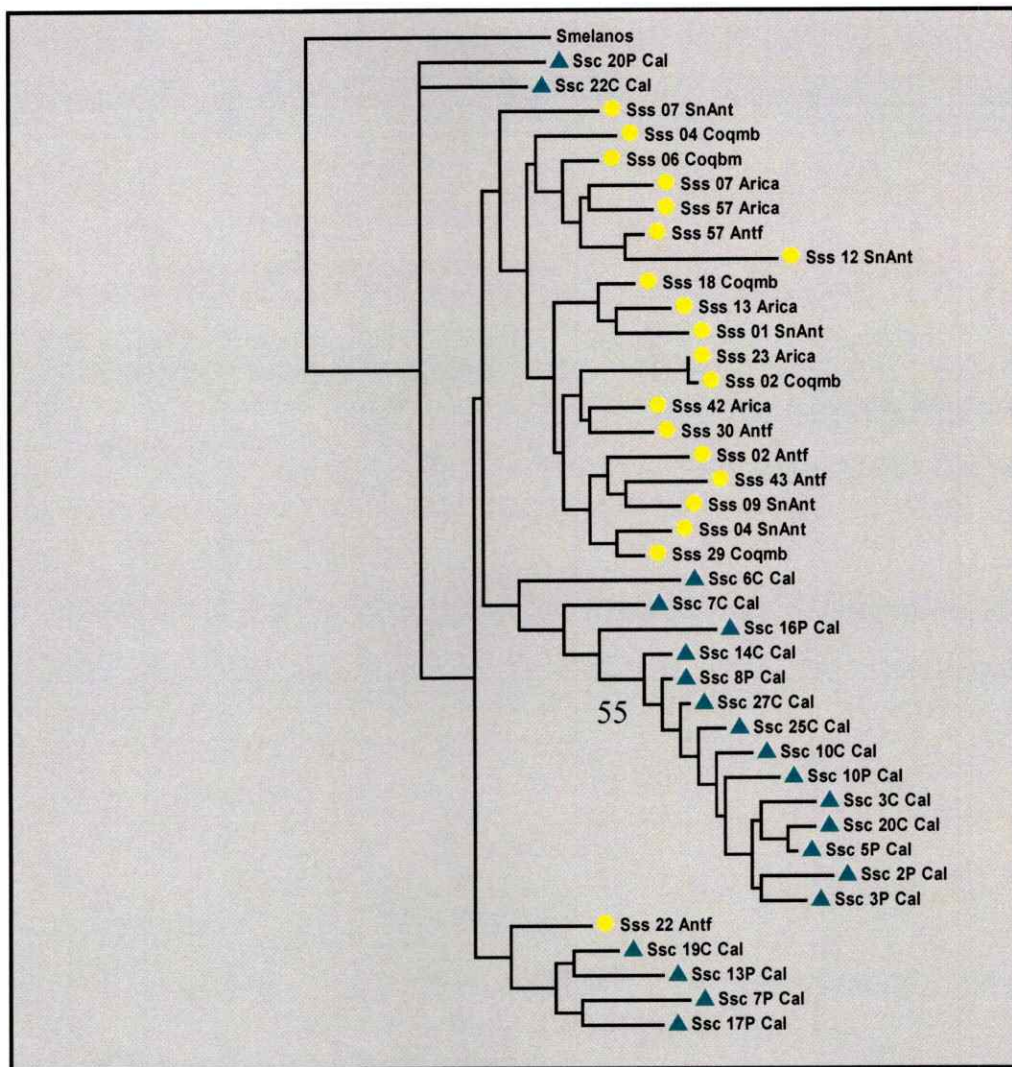


**Fig. 21:** Árbol por MP, basado en secuencias de Cyt b, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Engraulis*, fondo naranja muestra haplotipo de *E. mordax*, fondo rosado haplotipos de *E. ringens* (largo del árbol = 239, índice de consistencia = 0.88, índice de homoplasia = 0.12). Haplotipo de *E. japonicus* y *Coilia nasus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep= 1000) para el análisis

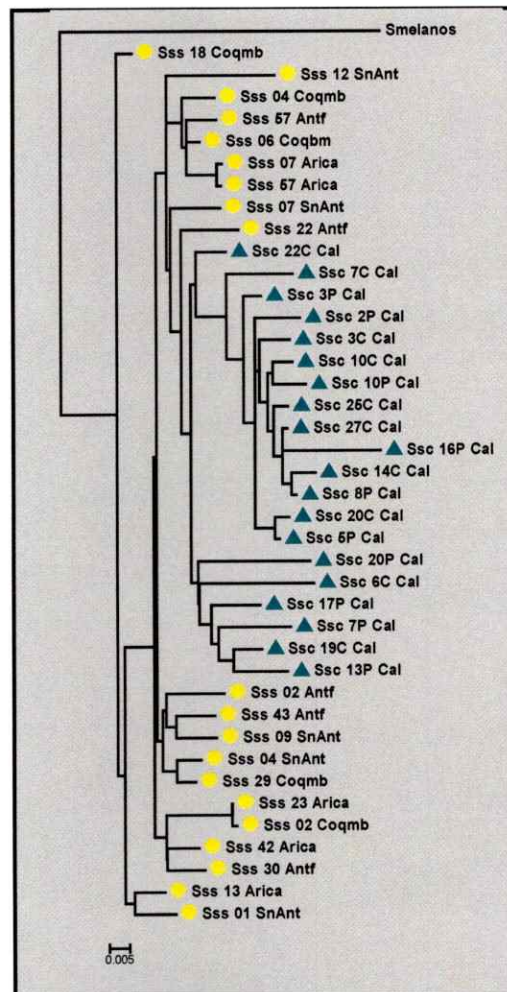


**Fig. 22:** Árbol por ML, basado en secuencias de Cyt b, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Engraulis*, fondo naranja muestra haplotipos de *E. mordax*., fondo rosado haplotipos de *E. ringens* (valor de  $-\ln$  likelihood = 1595.04497, modelo de sustitución nucleotídica empleado = TrN+I). Haplotipos de *E. japonicus* y *E. encrasicolus* se ocuparon como grupo externo. El valor sobre los nodos representa el porcentaje de bootstrap (nrep= 1000) para el análisis.

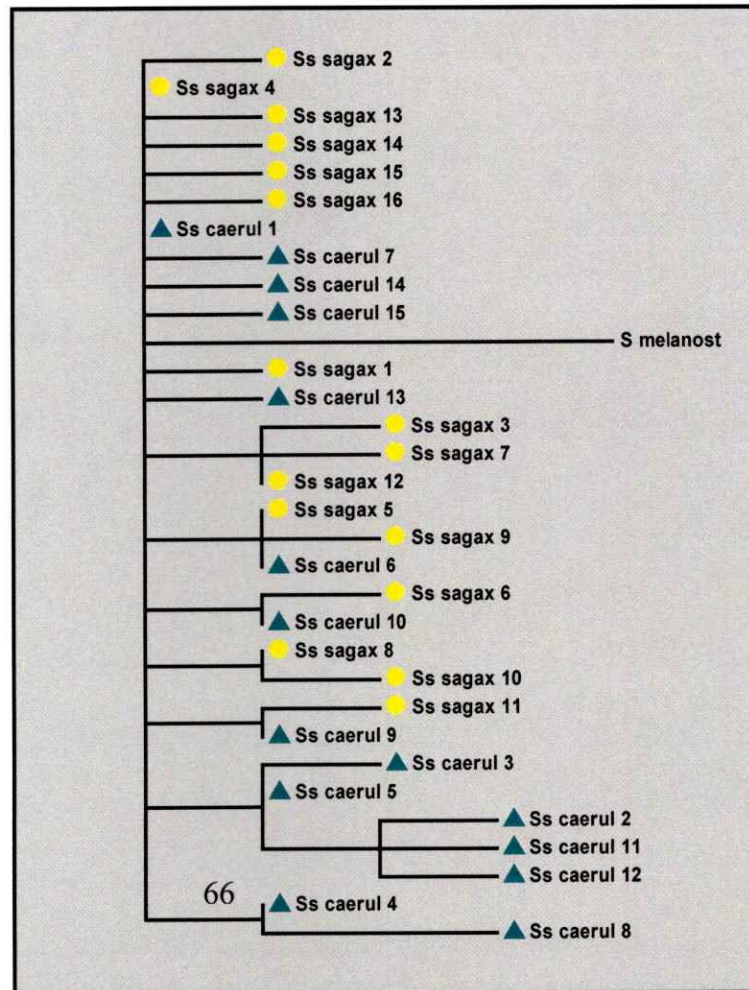




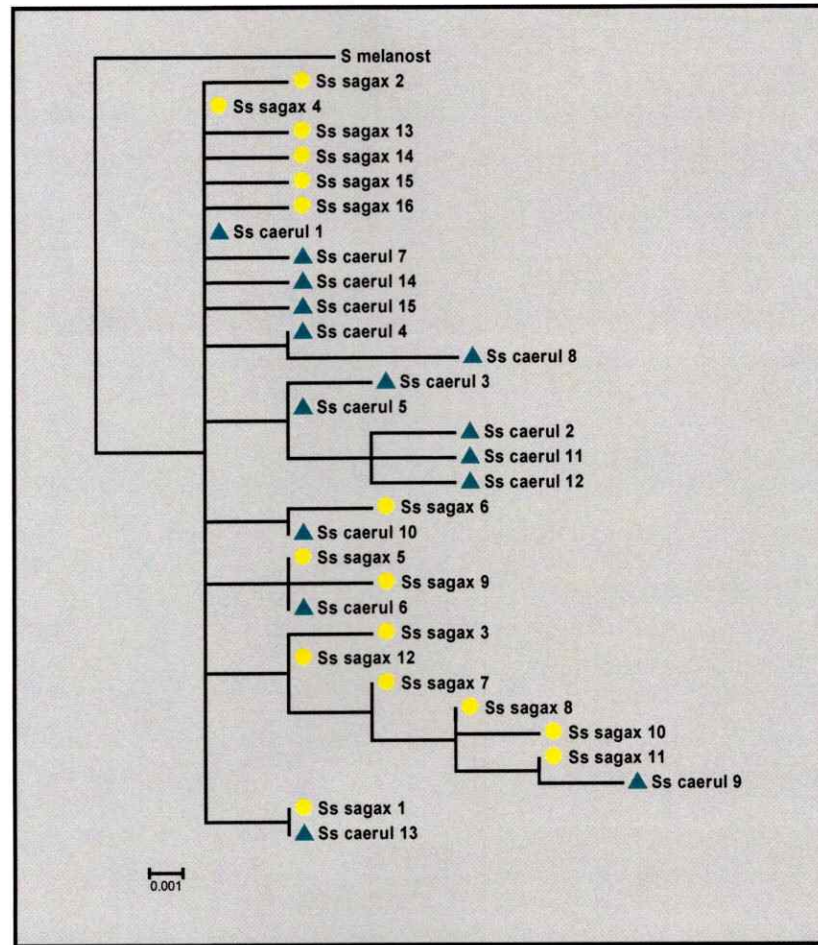
**Fig. 23:** Árbol por MP, basado en secuencias de RC, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Sardinops*, círculos amarillos corresponden a haplotipos de *S.s. sagax*, triángulos verdes corresponden a haplotipos de *S.s. caeruleus* (largo del árbol = 398, índice de consistencia = 0.42, índice de homoplasia = 0.57). Haplotipo de *S. melanostictus* se ocupó como grupo externo. Solo un nodo presenta un porcentaje de bootstrap mayor a 50% (nrep= 1000) para el análisis



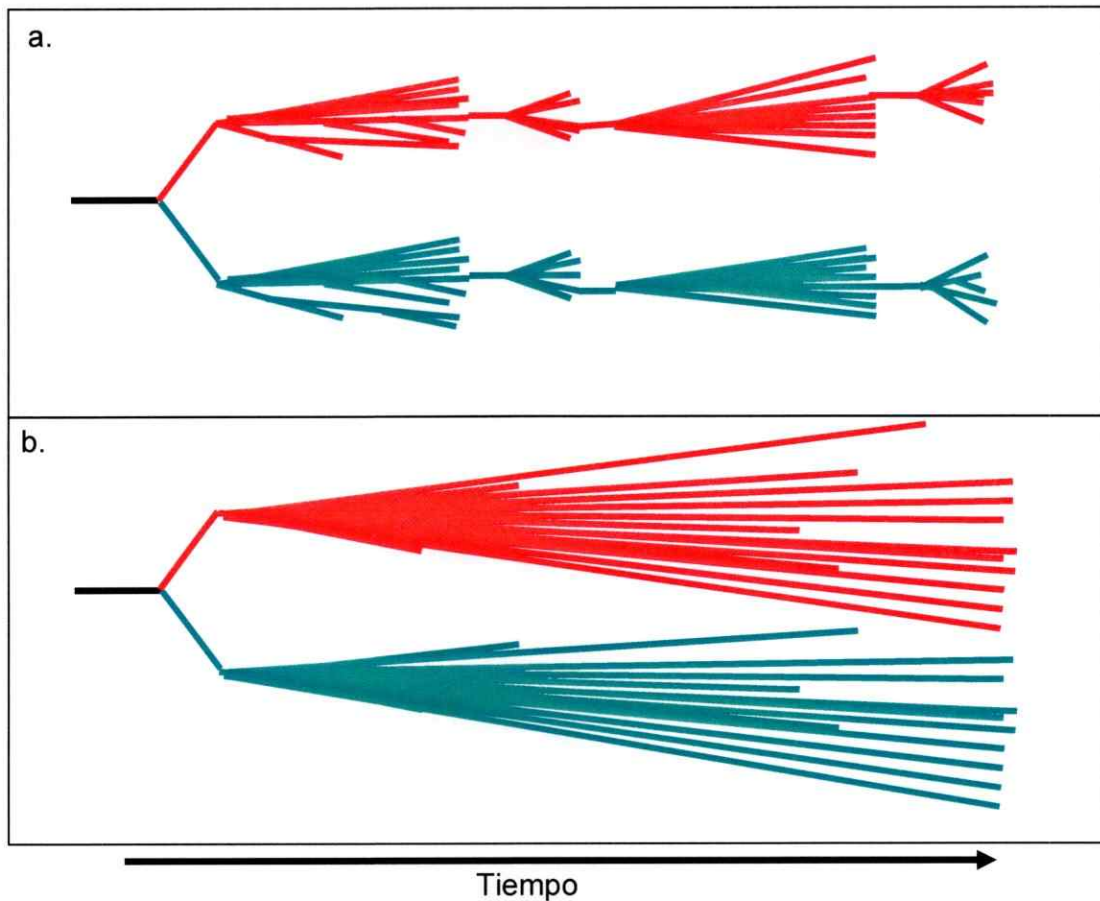
**Fig. 24:** Árbol por ML, basado en secuencias de RC que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Sardinops*, círculos amarillos representan haplotipos de *S. sagax* y triángulos verdes corresponden a haplotipos de *S. caeruleus* (valor de  $-\ln$  likelihood = 3627.32676, modelo de sustitución nucleotídica empleado = K81uf+I+G). Haplotipo de *S. melanostictus* se ocupó como grupo externo. Árbol no presenta nodos con valores de bootstrap significativos.



**Fig. 25:** Árbol por MP, basado en secuencias de Cyt b, que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Sardinops*, círculos amarillos corresponden a haplotipos de *S.s. sagax*, triángulos verdes corresponden a haplotipos de *S.s. caeruleus* (largo del árbol = 33, índice de consistencia = 0.81, índice de homoplasia = 0.18). Haplotipo de *S. melanostictus* se ocupó como grupo externo. Solo un nodo presenta un porcentaje de bootstrap mayor a 50% (nrep = 1000) para el análisis



**Fig. 26:** Árbol por ML, basado en secuencias de Cyt b que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en el género *Sardinops*, círculos amarillos representan haplotipos de *S.s. sagax* y triángulos verdes corresponden a haplotipos de *S.s. caeruleus* (valor de  $-\ln$  likelihood = 768.61229 modelo de sustitución nucleotídica empleado = TrN+I). Haplotipo de *S. melanostictus* se ocupó como grupo externo. Árbol no presenta nodos con valores de bootstrap significativos.



**Fig. 27:** Modelos de evolución propuestos en (a) para *Trachurus murphyi* - *Trachurus symmetricus* y *Engraulis ringens* - *Engraulis mordax*, que muestra una población ancestral de la que se generan dos poblaciones distintas (representadas por colores distintos), una en cada hemisferio en el Pacífico-Oriental, y que revelan un proceso de extinción-recolonización similar en ambas especies. (b) *Sardinops sagax* - *Sardinops caeruleus*, que muestra una población ancestral de la que se generan dos poblaciones distintas (representada por distintos colores), una en cada hemisferio en el Pacífico-Oriental, seguido por un crecimiento poblacional y tamaños de población estables (modificado de Grant & Bowen, 1998).

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Alegria V, Proyecto FIP 93-17 (1994) Estudio biológico pesquero del recurso jurel en la zona norte (I y II Regiones) Informe final.
- Arbogast, B.S., Edwards, S.V., Wakeley, J., Beerli, P. & Slowinski, J.B., (2002). Estimating Divergence Times from Molecular Data on Phylogenetic and Population Genetic Timescales. *Annual Review of Ecology & Systematics* 33: 707-740.
- Awise J.C., (1985). Identification and interpretation of mitochondrial DNA stocks in marine species. *Proceedings of Stocks Identification Workshop*. (Kumpf, Vaught, Grimes, Johnson, Nakamura ed.). U.S. National Oceanic and Atmospheric Administration : Panama City Beach, Florida. Pp. 105-136.
- Ayres, W.O., (1855). Descriptions of new species of Californian fishes. A number of short notices read before the Society at several meetings in 1855. *Proc. Calif. Acad. Sci. (Ser. 1)* 23-77.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37- 48.
- Berggren, W.A., Hollister, C.D., (1977). Plate tectonics and paleocirculation - commotion in the ocean. *Tectonophysics* 38:11-48
- Bermingham, E., McCaVerty, S.S., Martin, A.P., (1997). Fish biogeography and molecular clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. In: Kocher, T.D., Stepien, C.A. (Eds.), *Molecular Systematic of Fishes*. Academic Press, New York, pp. 113-128.
- Billington N., (2002) Mitochondrial DNA. In: *Principles and Practices for Fisheries Scientists* (Hallerman ed), American Fisheries Society.
- Blackburn, J.M., (1950). Studies on Age, Growth, and Life History of the Pilchard, *Sardinops neopilchardus* (Steindachner), in Southern and Western Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 1 pp. 221-258.
- Blard, P.H., Lavé, J., Pik, R., Wagnon, P., Bourlés, D., (2007). Persistence of full glacial conditions in the central Pacific until 15,000 years ago. *Nature* 449 pp. 591-594.

- Bowen, B.W., & Grant, W.S., (1997). Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): assessing biogeographic models and population histories in temperature upwelling zones. *Evolution*, **51**: 1601–1610.
- Bowen, B.W., Bass, A.L., Rocha, L.A., Grant, W.S., Robertson, D.R., (2001). Phylogeography of the Trumpetfishes (*Aulostomus*): Ring species complex on a global scale. *Evolution*: Vol. 55, No. 5 pp. 1029–1039.
- Bromham, L., & Cardillo, M. (2003) Testing the link between the latitudinal gradient in species richness and rates of molecular evolution. *J. Evol. Biol.* **16**: 200–2007.
- Bromham, L., & Penny, D. (2003). The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 216–224.
- Bromham, L., (2002). Molecular clocks in reptiles: life history influences rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **19**:302–309.
- Brown, J.H., & Lomolino, M.V., (1998). *Biogeography*. Sinauer Associates.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T., & Smith, M.J., (1993). Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molec. Biol. Evol.*, **10**: 326–341.
- Brown, W.M., George, M., Jr., & Wilson, A.C., (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 1967–1971.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C., (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* **18**:255–239.
- Budyko, M.I., Rombo, A.B., and Yanshin, A.I., (1985). *The history of the Herat atmosphere*. Berlin, Springer-Verlag, 139p.
- Burridge, C.P., (2002). Antitropicality of Pacific fishes: molecular insights. *Environmental Biology of Fishes* **65**:151–164.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta, M.N., Saccone, C., (1994). Evolutionary Analysis of Cytochrome b sequences in some perciformes: Evidence for a slower rate of evolution in mammals. **39**:589–597.
- Cárdenas, L., Hernandez, C., Poulin, E., Magoulas, A., Kornfield, I., Ojeda, F.P., (2005). Origin, diversification, and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **35**, 496–507.

- Cherry, J. L., (1998). Should we expect substitution rate to depend on populations saize?. *Genetics*, 150: 911-919.
- Chiappa-Carrara, X., Gallardo, M., Jacob-Cervantes, M., (1989). Análisis del régimen alimntario de tres poblaciones de la anchoveta *Engraulis mordax* Girard (Pisces: Engraulidae), en el norte de Baja California. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Univ. Nal. Auton. México*, 16(2): 361-377.
- CLIMAP Project Members Geol. Soc. Am., (1981). Seasonal reconstruction of the earth surface at the last glacial maximum. ser. 36 Map & Chart.
- CLIMAP Project Members Science The surface of the ice-age earth. (1976). 1131-1137.191
- Collette, B. B., and Smith, B. R. (1981). Bluefin tuna, "*Thunnus thynnus orientalis*", from the Gulf of Papua. *Jpn. J. Ichthyol*, 28: 166-168.
- Cox, C.B., (1990). New geological theories and old biogeographical problems. *J. Biogeogr.* 17: 117-130.
- Crame, J.A., (1993). Bipolar molluscs and their evolutionary. implications. *Journal of Biogeography*, 20, 145-161.
- Cubillos, L., (1998). Evaluación indirecta del stock de anchoveta y sardina común en la zona centro-sur, Informe Final FIP.
- Cubillos, L.A., Arcos, D.F., Canales, M., Bucarey, D., (2001). Seasonal growth of small pelagic fish off Talcahuano (378S-738W), Chile: a consequence of their reproductive strategy to seasonal upwelling? *Aquat Living Res.* 14:115-124.
- Cubillos, L.A., Bucarey, D., Canales, M., (2002). Monthly abundance estimation for common sardine *Strangomera bentincki* and anchovy *Engraulis ringens* in the central-southern area off Chile (34-408 S). *Fish Res.* 57:117-130.
- Cubillos. L., Canals M., Bucarey. S., Rojas. A., Alarcón, R., (1999). Epoca reproductiva y talla media de primera madurez sexual de *Strangomera bentincki* y *Engraulis ringens* en el período 1993-1997, en la zona centro-sur de Chile. *Invest. Mar., Valparaíso*, 27: 73-85, 1999.
- Danil'Chenko, P.G., (1964). Superorder Teleostei. In: *Osnovy Paleontologiy (Principles of Paleontology)*, Agnatha, Pisces. Nauka Press, Moscow.



- Donaldson, K.A, and Wilson Jr. R.R., (1999). Amphi-Panamic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA Control Region of fishes. *Mol. Phyl. Evol.* 13:208-213.
- Donnelly, P., & Joyce, P., (1992). Weak Convergence of Population Genealogical Processes to the Coalescent with Ages. *The Annals of Probability*, Vol. 20, No. 1, pp. 322-341.
- Ekman, S., (1953). *Zoogeography of the Sea*. Sidwick and Jackson. Londres 417 p.
- FAO. (2001) FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit.
- Eschmeyer, W.N. (Ed.). (2003). Catalog of fishes. Updated database version of March 2003. Catalog database as made available to FishBase in March 2003. World Wide Web electronic publication. Available from: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
- Felsenstein, J., (1981). Related articles, links evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.
- Féral J.P., (2002). How useful are the genetic markers in attempt to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 121-145.
- Filatov, D.A., (2002) PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2, 621-624.
- Girard, C.F., (1854). Descriptions of new fishes, collected by Dr. A. L. Heermann, naturalist attached to the survey of the Pacific railroad route, under Lieut. R. S. Williamson, U. S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. Phila.* 129-140.
- Grant, W.S. & Leslie R.W. (1996). Late Pleistocene dispersal of Indian-Pacific sardine populations in an ancient lineage of the genus *Sardinops*. *Marine Biology*, 126:133-142.
- Grant, W.S., & Bowen B.W., (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity* 89: 415-426.
- Grant, W.S., Clark, A.M., Bowen, B.W., (1998). Why restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA failed to resolve sardine (*Sardinops*) biogeography: insights from mitochondrial DNA cytochrome b sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55: 2539-2547
- Grant, W.S., Leslie, R.W., Bowen, B.W., (2005). Molecular genetic assessment of

- bipolarity in the anchovy genus *Engraulis*. *Journal of Fish Biology*, 67, 1242-1256.
- Griffiths, R.C., Tavaré, S., (1994). Ancestral inference in population genetics. *Stat. Sci.*, 9, pp. 307-319.
- Haug G.H., Tiedemann, R., (1998). Effecto of the formation of the Isthmos of Panama on Atlantic Ocean thermohaline circulation. *Nature*, v. 393, p. 673-676.
- Haug, G.H., (2004). How the Isthmus of Panama put ice in the artic. *Oceanus Magazine*. Vol 42, No 2.
- Haug, G.H., Ganopolski, A., Sigman, D.M., Rosell-Mele, A., Swann, G.E., Tiedemann, R., Jaccard, S.L., Bollmann, J., Maslin, M.A., Leng, M.J., and Eglinton, G., (2005). North Pacific seasonality and the glaciation of North America 2.7 million years ago. *Nature* v. 433, p. 821-825
- Haug, G.H., Tiedemann, R., Zahn, R., Ravelo, A.C., (2001). Role of Panama uplift on oceanic freshwater balance. *Geology*. V. 29, p. 207-210.
- Hauser, L. and Ward, R.D., (1998) Population identification in pelagic fish: the limits of molecular markers. Pp. 191-224 in: *Advances Molecular Ecology* (Carvalho G.R., ed). IOSPress, Amsterdam.
- Held, C., (2001). No evidence for slow-down of molecular substitution rates at subzero temperatures in Antarctic serolid isopods (Crustacea, Isopoda, Serolidae). *Polar Biol.* 24:497-501.
- Helgason, A., Sigurðardóttir, S., Gulcher, J., Ward, R., & Stefánsson, K., (2000). mtDNA and the origin of the Icelanders: Deciphering signals of recent population history. *American Journal of Human Genetics* 66: 999-1016.
- Hilbish, T. J., Mullinax, A., Dolven, S.I., Meyer, A., Koehn, R.K., and Rawson, P.D., (2000). Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of trans-equatorial migration. *Marine Biology* 136: 69-77.
- Hinojosa, L.F.; Villagrán, C. (1997). Historia de los bosques del sur de Sudamérica, I: antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural*, Vol. 70, p. 225-239.
- Hubbs, C.L., (1952). Anfitropical distribution of fishes and other organisms. *Symposium on the problems of bipolarity and of pantempe faunas*. *Proceedings*

- of the Seventh Pacific Science Congreso (Pacific Science Association) 3: 324-329.
- Hubbs, C.L., Mead, G.W., and Wilimovsky, N.J., (1953). The widespread, probably anti-tropical distribution and relationship of the bathypelagic iniomous fish *Anotopterus pharao*. Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif. 6(5):173-198.
- Hudson, R.R., (1991). Gene genealogies and the coalescent process. In Oxford Surveys in Evolutionary Biology (Eds D. Futuyama and J. Antonovics), volume 7, pp. 1-44. Oxford University Press.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. & Wilson, A.C., (1991). Evolution of the cytochrome b gene of animals. Journal of Molecular Evolution 32, 128-144.
- Jenyns, L., (1842). The zoology of the voyage of H. M. S. Beagle, under the command of Captain Fitzroy, R. N., during the years 1832 to 1836. London: Smith, Elder, and Co. Issued in 4 parts. Fish, Voyage Beagle i-xvi + 1-172.
- Johns, G.C., & John C.A., (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b Gene. Mol. Biol. Evol. 15:1481-1490.
- Kawasaki, T., Tanaka, S., Toba Y., and Taniguchi A., (eds.). (1991). Long-term variability of pelagic fish population and their environmental. Pergamon Press, Tokyo, Japan. 402 pp.
- Keller G., Zenker, C.E., Stone, S.M., (1989). Late Neogene history of the Pacific-Caribbean gateway. Journal of South American earth sciences . 2, 73-108.
- Kimura, M., (1968). Evolutionary rate at the molecular level. Nature 212, 624-626.
- Kimura, M., (1971). On the rate of molecular evolution. J. Mol. Evol. 1,1-17.
- Kimura, M., (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kimura, M., (1983). The Natural Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kingman, J.F.C., (1982). On the genealogy of large populations. J. Appl. Prob. 19:27-43.

- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M., (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163
- Landini, W., Bianucci, G., Carnevale, G., Ragaine, L., Sorbini, C., Valleri, G., Bisconti, M., Cantalamessa, G., Di Celma, C., (2002). Late Pliocene fossils of Ecuador and their role in the development of the Panamic Bioprovince after the rising of Central American Isthmus. *Can. J. Earth Sci.* 39, 27-41.
- Lecomte, F., Grant, W.S., Dodson, J.J., Rodríguez-Sánchez, R., Bowen, B.W., (2004). Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in east pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology* 13 (8) 2169-2182.
- Lindberg, D.R., (1991) Marine biotic interchange between the northern and southern hemispheres. *Paleobiology* 17: 308-324.
- Lluch-Belda D, Crawford, R.J.M., Kawasaki, T., MacCall, A.D., Parrish, R.H., Schwartzlose, R.A., and Smith, P.E., (1989). World-wide fluctuations of sardine and anchovy stocks: the regime problem. *S. Afr. J. mar. Sci.* 8: 195-205.
- Martin, A.P., & Palumbi, S.R., (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular reloj. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4087-4091.
- Martin, A.P., (1995). Metabolic rate and direccional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 12: 1124-1131.
- Medina, M., & Arancibia, H., (1992). Interacciones tróficas entre el jurel (*Trachurus murphyi*) y la caballa (*Scomber japonicus*) en el ecosistema pelágico de la zona norte de Chile. *Invest. Cient. Tecnol. Ser. Cienc. Mar.* 2: 67-78.
- Mercer, J.H., (1976). Glacial history of southern-most South America. *Quaternary Research* 6, 125-166.
- Meyer, A.T., Kocher, D., Basasibwaki P., and Wilson, A.C., (1990). Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347: 550-553.
- Mooers, A., & Harvey, P.H., (1994). Metabolic rate, generation time and the rate of molecular evolution in birds. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3:344-350.
- Nei, M., & Kumar, S., (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

- Nei, M., (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nekrasov, V.V., (1994). *Mackerels of the World Ocean (genus Trachurus)*. VINRO, Moscow pp. 1-228.
- Nelson, G., (1983). *Anchoa argentivittata*, with notes on the eastern Pacific anchovies and the Indo-Pacific genus *Encrasichalina*. *Copeia* 1983, 48-54.
- Nelson, G., (1984). Identity of the anchovy *Hildebrandichthys setiger* with notes on relationships and biogeography of the genera *Engraulis* and *Cetengraulis*. *Copeia* 1984, 422-427.
- Nelson, G.J., (1985). A decade of challenge: the future of biogeography. In: *Plate Tectonics and Biogeography* (Leviton, A. E. & Aldrich, M. L., eds). *Journal of the History of Earth Science Society*. 4: 187-196.
- Nichols, J.T., (1920). A key to the species of \**Trachurus*\*. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 477-481.
- Ohta, T., & Kimura, M., (1971). On the constancy of the evolutionary rate of cistrons. *J. Mol. Evol.* 1: 18-25.
- Ohta, T., (2002). Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99 16134-16137.
- Okazaki, T., Kobayashi, T., Uozumi, Y., (1996). Genetic relationships of pilchards (genus: *Sardinops*) with antitropical distributions. *Marine Biology* 126: 585-590.
- Pawar, S.S., (2005). Geographical variation in the rate of evolution: Effect of available energy or fluctuating environment? *Evolution*, 59: 234-237.
- Posada, D., & Crandall, K.A., (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Poulin, E., Cárdenas, L., Hernández, C.E., Kornfield, I., & Ojeda, F.P., (2004). Resolution of the taxonomic status of Chilean and Californian jack mackerels using mitochondrial DNA sequence. *Journal of Fish Biology* 65, 1-5.
- Pulquério, M.J.F., Nichols, R.A., (2006). Dates from the molecular clock: how wrong can we be? *Trends Ecol. Evol.* 22::180-4.
- Quinn, T.W. (1992). The genetic legacy of mother goose: phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. *Mol. Ecol.* 1: 105-117.

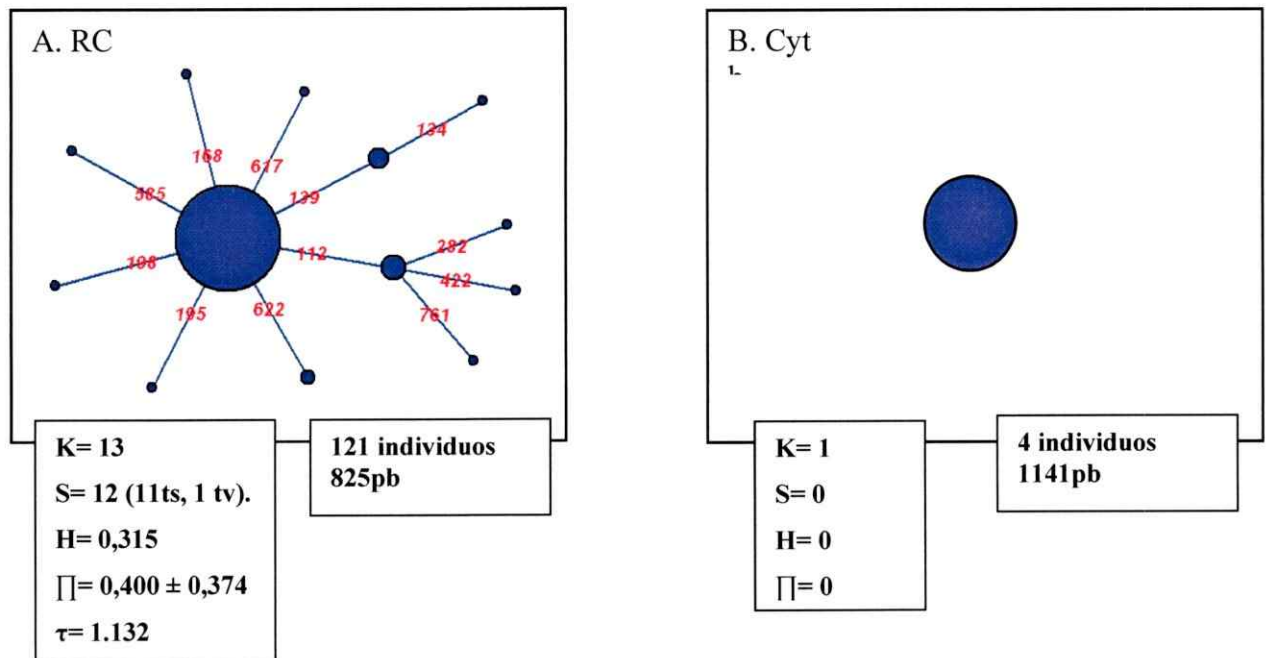
- Randall, J. E., (1981). Exemples of antitropical an antiequatorial distribution of Indo-West-Pacific fishes. *Pac.Sci.*, 35: 197-209.
- Raymond, M., & Rousset, F., (1995). An exact tes for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Reynolds, J., Weir, B.S., & Cockerham, C.C., (1983). Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767-779.
- Rogers, A.R., Harpending, H., (1992). Population grow makes wavws in the distribution of parwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 552-569.
- Rosenberg, N.A., & Nordborg, M., (2002) Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature* 3: 380-390.
- Rozas, J & Rozas, R., (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Saitou, N., & Nei, M., (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T., (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press.
- Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L., (2000). ARLEQUIN, Version 2000: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.*
- Serra, R., (1991). Important life history aspects of the Chilean jack mackerel, *Trachurus symmetricus murphyi*. *Invest. Pesq. (Chile)* 36: 67-83.
- Shaklee, J., Currens, K., (2002) Genetic Stock Identification. In: *Principles and Practices for Fisheries Scientists* (Hallerman ed), American Fisheries Society.
- Steininger, F.F., Rabeder, G., & Rögl, F., (1985). Land mammal distribution in the Mediterranean Neogene: a consequence of geokinematic and climatic events. In: *Geological evolution of the Mediterranean basin* (Stanley, D.J., and Wezel, F.C., eds). New York: Springer Verlag; 559-571.
- Stewart, D.T., & Baker, A.J., (1994). Patterns of sequence variation in the mitochondrial D-loop region of shrews. *Molecular Biology and Evolution* 11: 9-21.

- Subsecretaria de pesca, Ficha Pesquera Sardina española (2006).
- Sunnucks, P., (2000) Efficient genetic markers for population biology. *TREE* Vol. 15, 5, pp 199 – 203.
- Swofford, D.L., (2002). PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., & Hillis, D.M., (1996). Phylogenetic inference. Pp. 407-514 in D. M. Hillis, C. Moritz, and B.K. Mable (eds.), *Molecular Systematics*, Second Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Taberlet, P., Meyer, A. & Bouvet, J., (1992). Unusually large mitochondrial variation in populations of the blue tit, *Parus caeruleus*. *Molecular Ecology* 1, 27–36.
- Thompson J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G., (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Thorpe, J.P., (1982). The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*. 13, 139-168.
- Tringali, M.D., Bert, T.M., Seyoum, S., Bermingham, E., Bartolacci, D., (1999). Molecular Phylogenetics and Ecological Diversification of the Transisthmian Fish Genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13:193-207.
- Valentine, J.W., (1984). Neogene marine climate trends; implications for biogeography and evolution of the shallow-sea biota. *Geology* 12: 647-650.
- Vawter, A.T., Rosenblatt, R., & Gorman, G.C., (1980). Genetic divergence among fishes of the Eastern Pacific and the Caribbean: support for the molecular clock. *Evolution* 34: 705-711.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T.D., & Wilson, A.C., (1989). Mitochondrial DNA Sequences in Single Hairs from a Southern African Population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9350 - 9354.
- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawks, K., & Wilson, A.C., (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA sequences. *Science* 253:1503-1507.

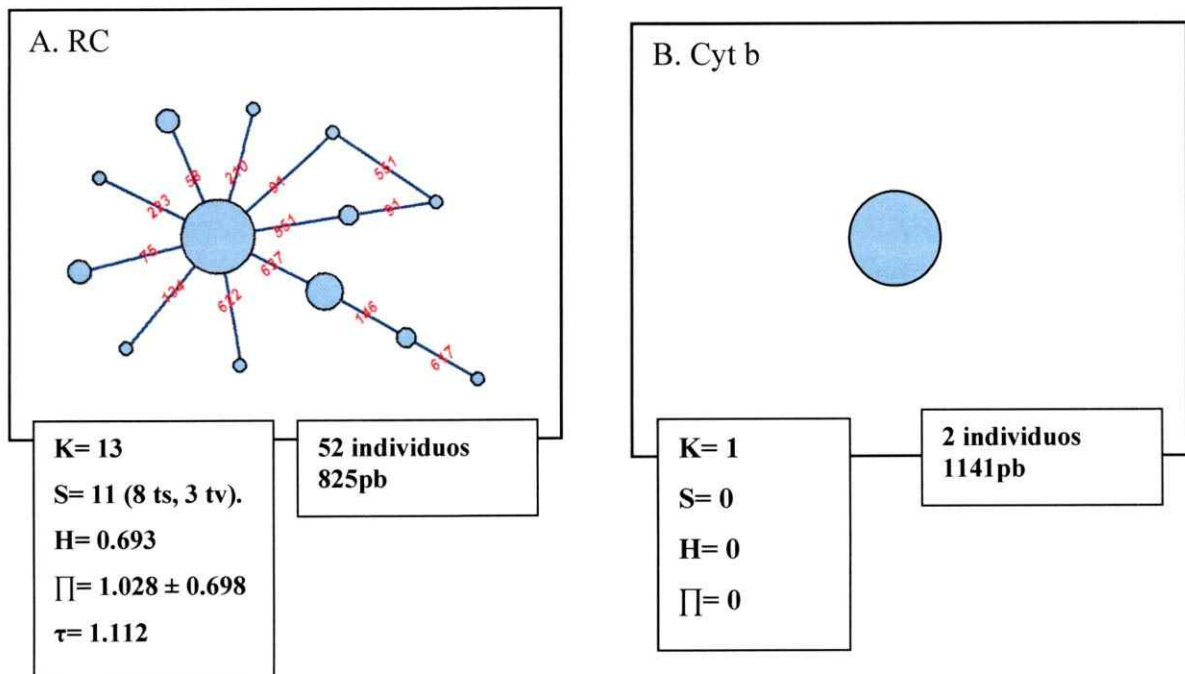
- Whitehead, P.J.P., Nelson, G.J. and Wongratana, T., (1988). FAO species catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeioidi). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2 - Engraulididae. FAO Fish. Synop. 125(7/2):305-579.
- Wong, M., (1973) Biología de la Sardina del Golfo de California (*Sardinops sagax caerulea*). California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations. Reports Volume XVII, 1 July 1971 to 30 June 1973. Instituto Nacional de Pesca, México.
- Wright, J.D., Miller, K.G., (1996). Control of North Atlantic Deep Water circulation by the Greenland-Scotland Ridge. *Paleoceanography* 11, 157-171.
- Wright, S.D., Gray R.D., Gardner, R.C., (2003). Energy and the Rate of Evolution: Inferences from Plant rDNA Substitution Rates in the Western Pacific. *Evolution*, 57: 2893-2898.
- Xia, X., and Xie. Z., (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.
- Yoder, A., Yang, Z., (2000). Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1081-1090.
- Zuckerandl, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving Genes and Proteins*. Bryson, V. & Vogel, H. J., eds, pp. 97-166, Academic Press.



## ANEXOS

1. GENERO *TRACHURUS*1.1. *Trachurus murphyi*

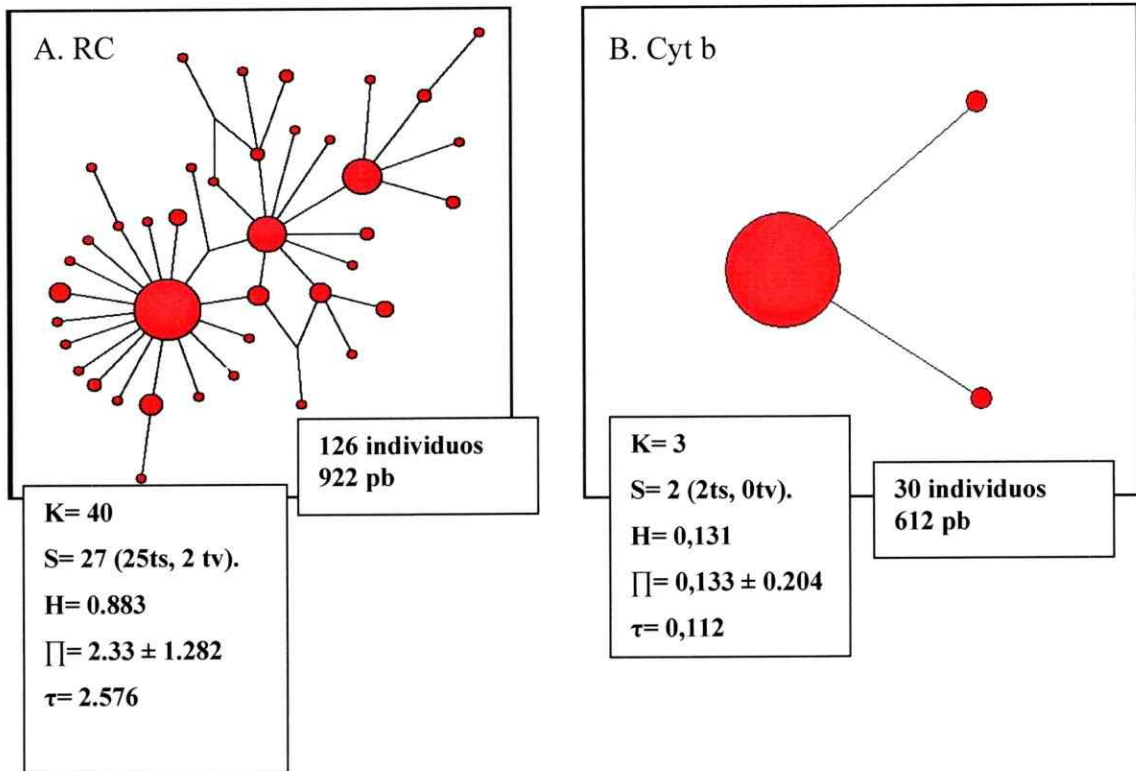
**Fig. 28:** Network filogenético por Median-joining de haplotipos de A) RC y B) Cyt b *Trachurus murphyi*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones.

1.2. *Trachurus symmetricus*

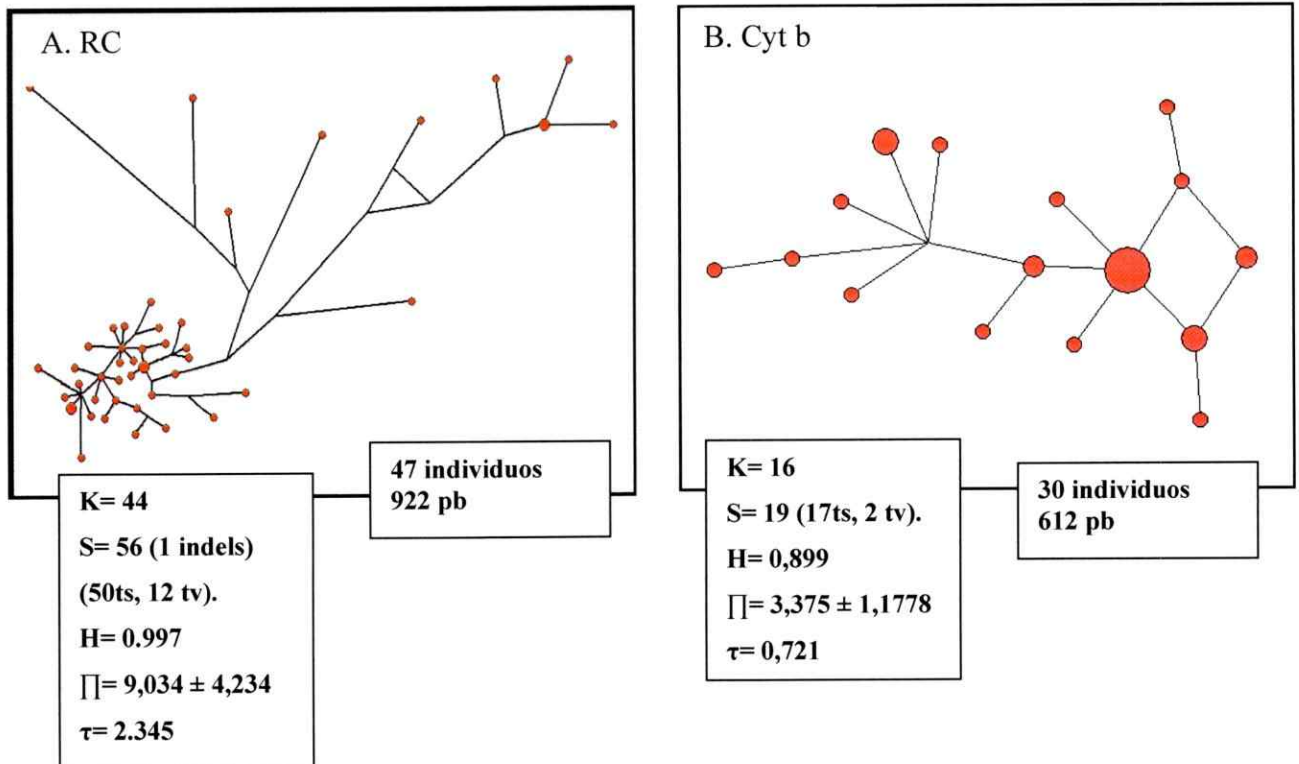
**Fig. 29:** Network filogenético por Median-joining de haplotipos de A) RC y B) Cyt b *Trachurus symmetricus*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones.

## 2. GENERO *ENGRAULIS*

### 2.1. *Engraulis ringens*



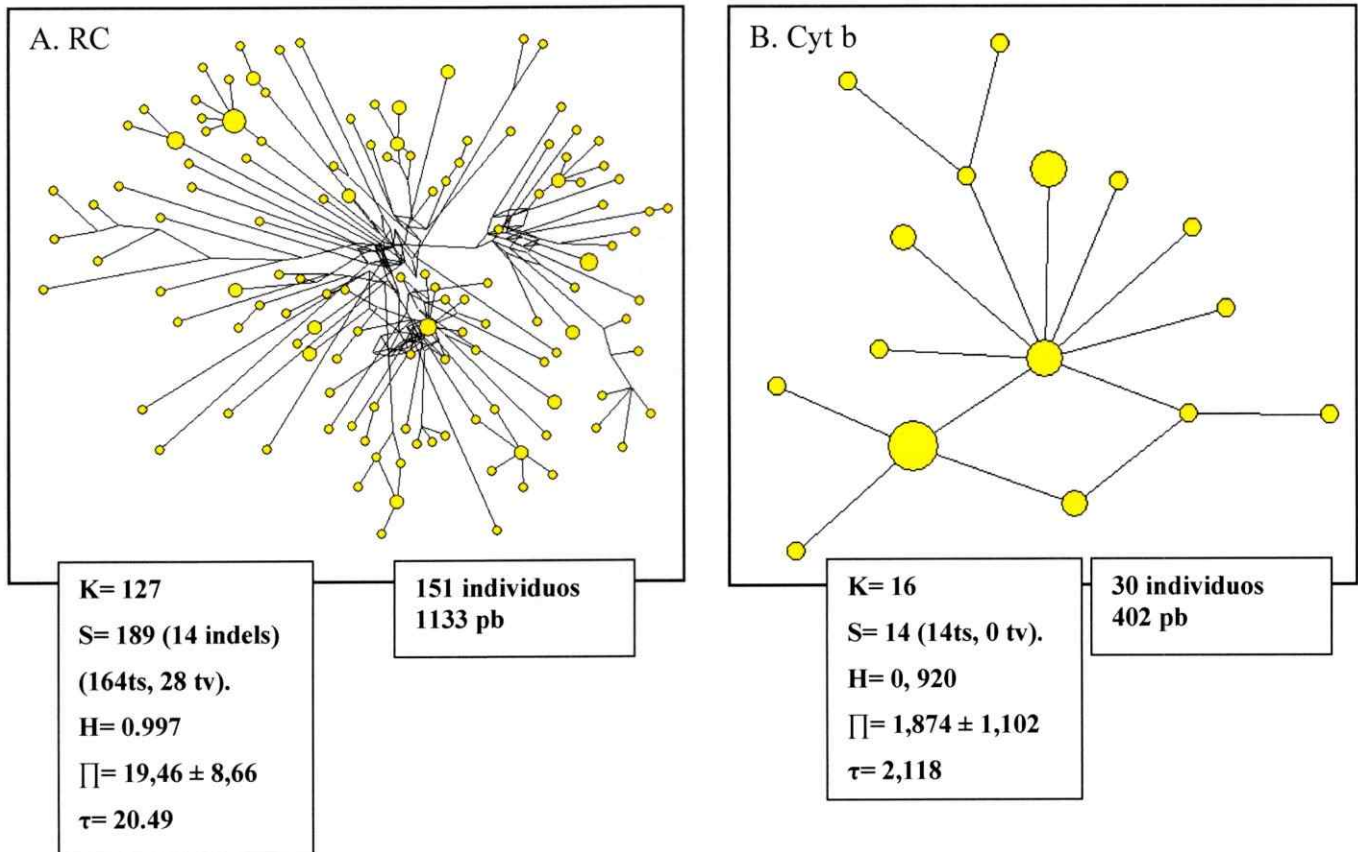
**Fig. 30:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de A) RC y B) Cyt b de *Engraulis ringens*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones.

2.2. *Engraulis mordax*.

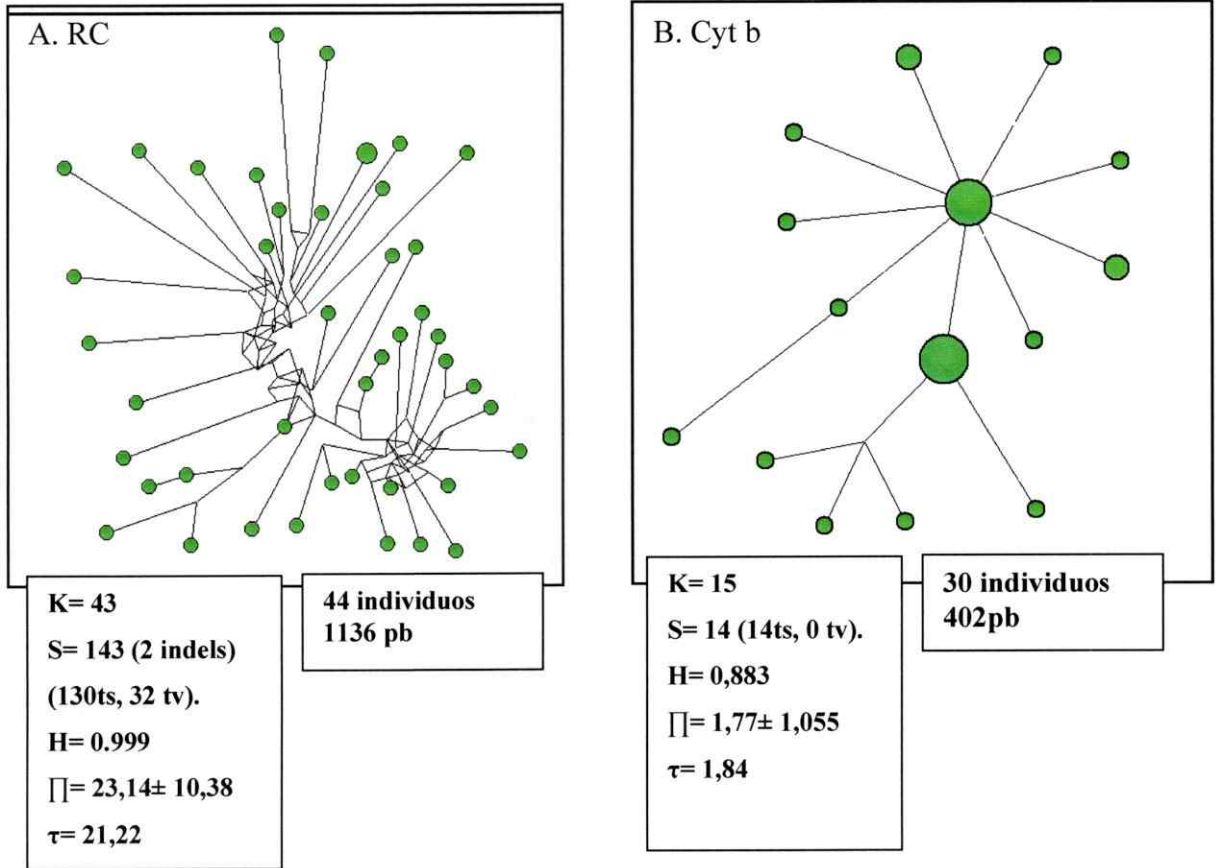
**Fig. 31:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de A) RC y B) Cyt b de *Engraulis mordax*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones

### 3. Género *SARDINOPS*

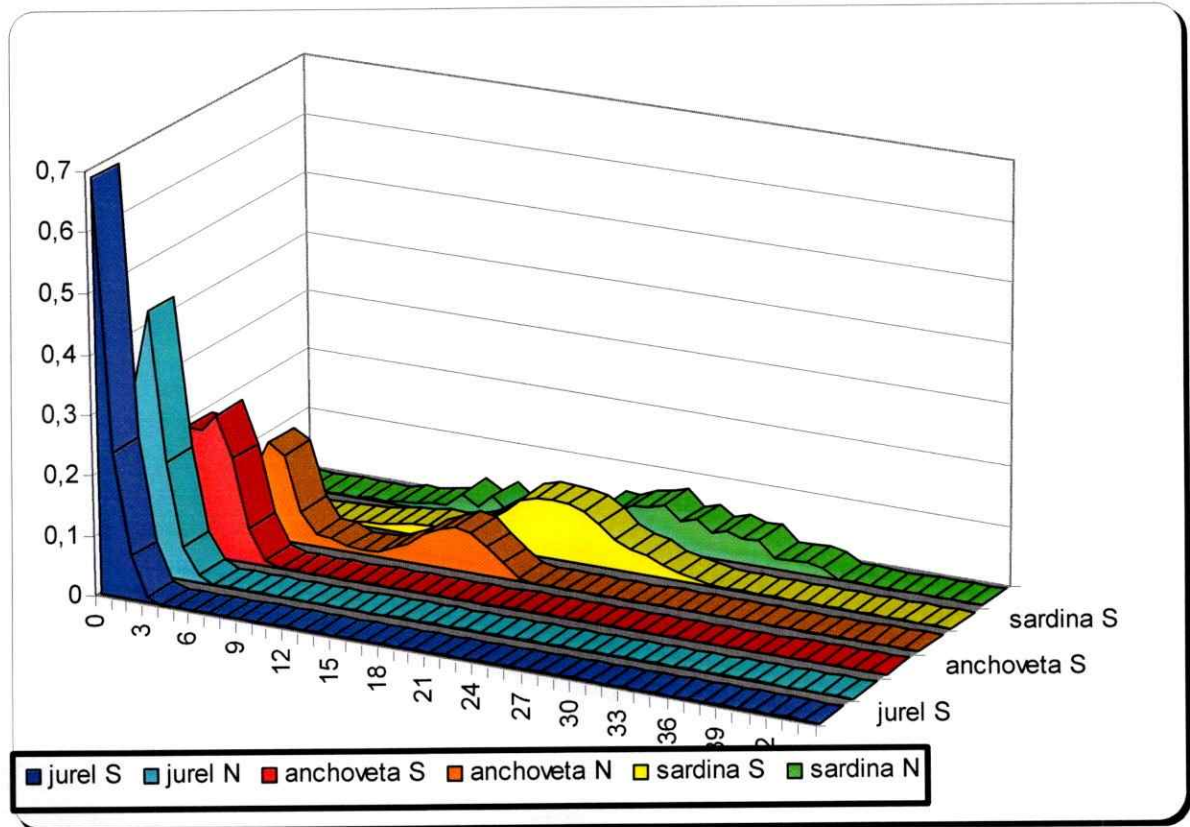
#### 3.1. *Sardinops sagax*



**Fig. 32:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de A) RC y B) Cyt b de *Sardinops sagax*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones.

3.2. *Sardinops caeruleus*

**Fig. 33:** Network filogenético por median-joining de haplotipos de A) RC y B) Cyt b de *Sardinops caeruleus*. Cada círculo representa un haplotipo presente en la muestra, el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en la muestra, la distancia entre haplotipos representa el número de sustituciones



**Fig. 34:** "Mismatch distribution" Región Control mtDNA. La grafica muestra por separado para las 6 especies el numero de diferencias entre pares de secuencias versus la frecuencia. *Trachurus murphyi* (jurel S, color azul), *Trachurus symmetricus* (jurel N, color celeste), *Engraulis ringens* (anchoveta S, color rojo), *Engraulis mordax* (anchoveta N, color naranjo), *Sardinops sagax* (sardina S, amarillo), *Sardinops caeruleus* (sardina N, verde).