

UCH-FC
DOC-EBE
I 93
C.A



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**Estructura poblacional y diversidad genética de calamares con historias de vida
contrastantes en el sistema de corrientes de Humboldt**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología

Evolutiva

Facultad de Ciencias

por

Christian Marcelo Ibáñez Carvajal

Junio, 2010

Director de Tesis: Dr. Elie Poulin

Co-Director de Tesis: Dr. (c) Luis A. Cubillos



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Doctorado presentada por el candidato

CHRISTIAN MARCELO IBÁÑEZ CARVAJAL

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar
al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el
examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de junio de 2010.

Directores de Tesis:

Dr. Elie Poulin

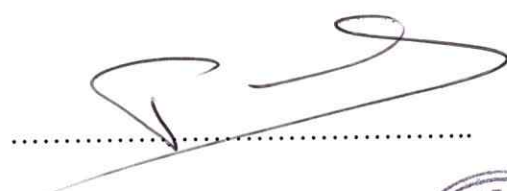
Dr. (c) Luis Cubillos

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Marco Méndez

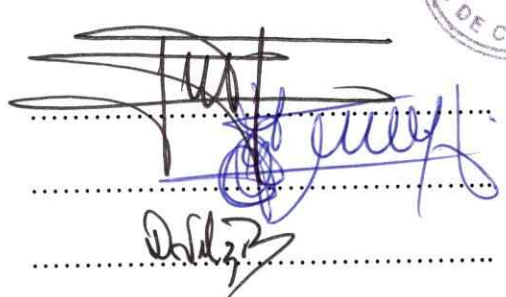
Dr. Eleuterio Yáñez

Dr. David Véliz



.....

.....



.....

Resumen autobiográfico



Soy Christian Marcelo Ibáñez Carvajal nací en Hualqui el 11 de junio de 1973. Después de pasar por varias entidades de educación pública terminé mi enseñanza media en el Liceo C-41 de Hualqui en diciembre de 1991. Desde el año 1992 hasta 1995 estudié la carrera técnica de Técnico Pecuario en PROPAM. Después de trabajar un tiempo en el sector agropecuario, decidí seguir estudiando una carrera profesional relacionada con la biología. Dentro de varias posibilidades (Veterinaria, Agronomía, Biología y Biología Marina) fui seleccionado en la carrera de Biología Marina en la Universidad Católica de la Santísima Concepción en 1997. En el año 1999 comencé a trabajar en la Facultad de Ciencias de esta universidad como ayudante de varios cursos y proyectos de investigación. Me titulé de Licenciado en Biología Marina y Biólogo Marino en 2004 en la nombrada universidad, y desde 2003 a 2005 trabajé en proyectos de investigación en el Instituto de Investigación Pesquera (INPESCA), Universidad de Concepción y Universidad Católica de la Santísima Concepción, y además en esta última tuve la oportunidad de realizar actividades de docencia en Biogeografía Marina y Evolución. En 2006 comencé mis estudios de Doctorado en la Universidad de Chile en el programa de Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva (EBE). Desde 2000 a 2009 he participado en más de 40 presentaciones en congresos y una veintena de publicaciones científicas.

Dedicatoria

"Cuando la mar está encrespada, trayendo a nuestra mente imágenes de lejanos barcos debatiéndose entre las olas, nuestros corazones ansían en silencio la desvanecida línea del horizonte. Cuando está tranquilo, sosegado, nosotros también lo estamos. Aunque estemos acostumbrados a él desde tiempos primordiales, siempre oculta un halo de misterio, como si algo, demasiado vasto para tomar forma, estuviese acechando en ese universo del que el mar es la puerta. En las mañanas, el océano, brillando con reflejos de blancas brumas y diamantinos vapores, tiene la mirada de alguien que reflexiona sobre extrañas cosas; su complicada textura, a través de la cual cientos de peces se zambullen, parece ocultar una enorme, perezosa entidad que un día logrará salir de entre las aguas inmemoriales y blancuzcas para caminar sobre la tierra."

"Existen hombres inteligentes, que aborrecen el mar, las ondulantes olas rompiendo en playas de arena amarilla; y aseguran que los que amamos los misterios de sus profundidades somos gentes extrañas. Pero aun así, siento una obsesión inexplicable por los encantos del océano. En la melancolía de la espuma teñida de plata por los rayos de la luna; en las olas sombrías, silenciosas, eternas, que baten desnudas arenas; en toda esa soledad solamente quebrada por la aparición de desconocidas existencias que afloran de abismos tenebrosos. Y cuando observo las terribles olas que arremeten con interminable poder, siento una fascinación cercana al miedo, y me rindo a los encantos de su grandeza antes que al odio por sus ondulantes aguas y su arrebatadora belleza."

Extractos de: Barlow R.H. & H.P. Lovecraft (1936) The Night Ocean. The Californian, IV, 3: 41-56.



Agradecimientos

En este pequeño espacio quiero expresar mis más profundos agradecimientos a todas las personas (colegas, amigos, familiares y otros) que de alguna manera me ayudaron en mi tesis de doctorado.

Primero está mi familia y amigos que siempre me han apoyado en mis proyectos de vida. Aquí incluyo a María Cecilia que ha sido un gran apoyo en todo momento en este corto camino, pero de un gran paso en el desarrollo personal y profesional en el que ambos decidimos seguir. La familia y amigos que no son científicos no siempre entienden el cómo, cuándo y por qué hacemos estas cosas tan extrañas, complicadas y a veces para algunos sin sentido, pero igual nos apoyan.

En segundo lugar deseo agradecerle a mi tutor Elie Poulin por haberme incluido en su laboratorio y haberme apoyado en mi idea de tesis. Al llegar al laboratorio no sabía prácticamente nada de la cocina molecular ni de los análisis de datos, ya que mi formación ha sido principalmente en biología y ecología marina. Claudio González, Angie Díaz, Elie Poulin, David Véliz han sido los profesores de laboratorio que me enseñaron las técnicas y análisis de datos moleculares. También es de gran valor la ayuda de mi co-director Luis Cubillos en los análisis de datos y en la colaboración de la confección de algunos artículos y revisión de la tesis. También otros colegas chilenos y extranjeros me ayudaron en la recolección de muestras, revisión de algunos capítulos, discusión de análisis e hipótesis, cartas de recomendación para las becas y apoyo con figuras, Rodrigo Moreno (UCHILE, Chile), Patricio Camus (UCSC, Chile), Karin Lohrmann (UCN, Chile), Miguel Araya (UNAP, Chile), Luis Adasme (IFOP, Chile), Renato Céspedes (IFOP, Chile), Ricardo Tafur (IMARPE, Perú) Juan Argüelles (IMARPE, Perú), Carmen Yamashiro

(IMARPE, Perú), Friedemann Keyl (ZMT, Alemania), y Alexander Arkhipkin (FIFD, Reino Unido).

En tercer lugar quiero agradecer a los miembros de la comisión evaluadora de la tesis Marco Mendez (UCHILE), David Véliz (UCHILE) y Eleuterio Yáñez (PUV), quienes han aportado con su visión desde varios puntos de vista distintos incluyendo la ecología, genética, evolución, y oceanografía.

Finalmente quiero expresar mis agradecimientos a CONICYT, la Universidad de Chile y el Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) por el apoyo financiero de las becas de Doctorado, Apoyo de Tesis, Pasantías y Congresos.





	Página
ÍNDICE DE MATERIAS	
PREFACIO	
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1.- Estructura y diversidad genética poblacional	4
1.2.- Los efectos del clima en la diversidad genética	6
1.3.- Sistema de estudio	9
1.4.- Modelos de estudio	14
1.5.- Planteamiento de objetivos e hipótesis	24
CAPÍTULO II. GENETIC DIVERSITY AND DEMOGRAPHIC HISTORY OF <i>DOSIDICUS GIGAS</i> (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE) IN HUMBOLDT CURRENT SYSTEM	41
CAPÍTULO III. SPATIAL GENETIC STRUCTURE AND DEMOGRAPHIC INFERENCE OF <i>DORYTEUTHIS (AMERIGO) GAHI</i> (D'ORBIGNY 1835) IN THE SOUTHEASTERN PACIFIC OCEAN	68
CAPÍTULO IV. PATRONES GENÉTICOS EN CALAMARES CON HISTORIAS DE VIDA CONTRASTANTES	92
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL	120
ANEXOS.	130



LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1.1 Comparación de las características de historia de vida de los calamares *D. gigas* y *D. gahi*.

CAPÍTULO II. GENETIC DIVERSITY AND DEMOGRAPHIC HISTORY OF *DOSIDICUS GIGAS* (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE) IN HUMBOLDT CURRENT SYSTEM

Table 2.1 Sample size, and genetic diversity indexes of *D. gigas* from the Humboldt Current System. For abbreviations see M&M.

Table 2.2 Fst values (above) and P values (below), of *D. gigas* from the Humboldt Current System

CAPÍTULO III. SPATIAL GENETIC STRUCTURE AND DEMOGRAPHIC INFERENCE OF *DORYTEUTHIS (AMERIGO) GAHI* (D'ORBIGNY 1835) IN THE SOUTHEASTERN PACIFIC OCEAN

Table 3.1 Sample size, and genetic diversity indexes of *D. gahi* from the Humboldt Current System. For abbreviations see M&M

Table 3.2 Fst values (above) and P values (below), of *D. gahi* from the Humboldt Current System

CAPÍTULO IV. PATRONES GENÉTICOS EN CALAMARES CON HISTORIAS DE VIDA CONTRASTANTES



Tabla 4.1. Resultados del Análisis de Varianza.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

Tabla 5.1 Resumen de las principales preguntas y los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1.1 Sistema de Corrientes de Humboldt (modificado de Thiel et al. 2007).

Figura 1.2 Modelo metapoblacional en el cual las poblaciones locales pasan por distintos procesos de extinción y re-colonización. Los círculos azules representan los sitios ocupados y los blancos las poblaciones extintas (modificado de Freeland 2005).

Figura 1.3 Modelo poblacional en el cual una población enorme y ampliamente distribuida pasa por reducciones y expansiones poblacionales. El tamaño de las elipses representan el tamaño poblacional (original del autor).

Figura 1.4 Rango geográfico del calamar *Dosidicus gigas* (modificado de Boyle & Rodhouse 2005).

Figura 1.5 Rango geográfico del calamar *Doryteuthis gahi* (modificado de Boyle & Rodhouse 2005).

Figura 1.6 Esquema resumido de la ontogénesis de los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* modificado de Arkhipkin (2010, comunicación personal).

Figura 1.7 Desembarques de los calamares *D. gigas* y *D. gahi* en Perú y Chile (Fuente FAO).

CAPÍTULO II. GENETIC DIVERSITY AND DEMOGRAPHIC HISTORY OF *DOSIDICUS GIGAS* (CEPHALOPODA: OMMASTREPHIDAE) IN HUMBOLDT CURRENT SYSTEM

Figure 2.1 Haplotype network of *D. gigas* from the Humboldt Current System

Figure 2.2 Mismatch distribution of *D. gigas* from the Humboldt Current System

Figure 2.3 Bayesian skyline plot showing changes in effective population size over time in *D. gigas*.

CAPÍTULO III. SPATIAL GENETIC STRUCTURE AND DEMOGRAPHIC INFERENCE OF *DORYTEUTHIS (AMERIGO) GAHI* (D'ORBIGNY 1835) IN THE SOUTHEASTERN PACIFIC OCEAN

Figure 3.1. Haplotype network of *D. gahi* in HCS.

Figure 3.2. Bayesian skyline plot of Peruvian (a) and Chilean (b) populations of *D. gahi* in HCS.

CAPÍTULO IV. PATRONES GENÉTICOS EN CALAMARES CON HISTORIAS DE VIDA CONTRASTANTES

Figura 4.1 Valores promedio de F_{st} de ambas especies de calamares en SCH. Las barras representan desviaciones estándar.

Figura 4.2 Diversidad genética de ambas especies de calamares en SCH. Las barras representan desviaciones estándar.

Figura 4.3 Curvas de rarefacción de *D. gahi* en SCH.

Figura 4.4 Curvas de rarefacción de *D. gigas* en SCH.

Figura 4.5 Frecuencia de los haplotipos encontrados en *D. gahi*.

Figura 4.6 Frecuencia de los haplotipos encontrados en *D. gahi*.

Figura 4.7 Escenario hipotético de la invasión geográfica de *D. gigas* y *D. gahi* en el Pleistoceno. Las elipses de colores representan la población ancestral.

PREFACIO

Esta tesis de doctorado se enfoca en los efectos que pueden tener las distintas estrategias de historia de vida en las características genéticas de las poblaciones de dos especies de calamares de las familias Ommastrephidae y Loliginidae (*Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi*, respectivamente) en el sistema de corrientes de Humboldt. La estructura de la tesis consta con cinco capítulos los cuales son explicados a continuación.

Capítulo 1.- Introducción

Esta sección es un preámbulo sobre la estructura genética poblacional, la diversidad genética y como estas características de las poblaciones se ven afectadas por los cambios climáticos. También se describen el sistema de estudio, en este caso el Sistema de Corrientes de Humboldt, y las especies modelo de estudio (cefalópodos). Finalmente, se presentan los objetivos y las hipótesis de esta tesis.

Capítulo 2.- Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt current system

En este capítulo se describen las características genético-poblacionales de una de las especies en estudio, *Dosidicus gigas*, y corresponde a un artículo en proceso editorial en la revista Marine Ecology Progress Series.

Capítulo 3.- Spatial genetic structure and demographic inference of *Doryteuthis (Amerigo) gahi* (d'Orbigny 1835) in the Southeastern Pacific Ocean

En este capítulo se describen las características genético-poblacionales de la segunda de las especies en estudio, *Doryteuthis gahi*, y corresponde a un artículo que será enviado a la revista Journal of Molluscan Studies.

Capítulo 4.- Patrones genéticos en calamares con historias de vida contrastantes

Aquí se conectan los dos capítulos anteriores en la comparación de la estructura poblacional y la diversidad genética de ambas especies. Este es el capítulo central de la tesis y es en éste donde se ponen a prueba las hipótesis propuestas inicialmente en

la introducción.

Capítulo 5.- Discusión general

Es en este capítulo donde se discuten las aproximaciones ecológico-evolutivas que se encontraron en cada capítulo y es en donde se conectan los artículos con los demás apartados y se discuten las hipótesis y resultados en base a la literatura existente.

Finalmente quiero enfatizar que esta monografía es el producto de la interacción con mi tutor Elie Poulin, mi co-director Luis Cubillos y la valiosa discusión con varios colegas y compañeros de laboratorio que me ayudaron a interpretar los datos moleculares para responder las preguntas ecológicas con implicancias evolutivas en este estudio.

Christian M. Ibáñez

Cantidades y simbología de las unidades de medida utilizadas

Longitud	Kilometro	km,	m,	cm,	mm,	μm
Volumen	Litro	L,	ml,	μl ,		
Tiempo	Minuto	Min,	seg,	ms,	μs ,	etc
Masa	Gramo	G,	mg,	μg ,	ng	g
Concentración	Molaridad	M,	mM,	μM ,		
Tamaño molecular	Pares de bases	Kpb,	pb			
Temperatura	Grados Celsius	$^{\circ}\text{C}$				

Abreviaciones Standard y convenciones.

Π	Número promedio de diferencias pareadas
π	Diversidad nucleotídica
F_{ST}	Índice de diferenciación entre poblaciones
F_{CT}	Índice de diferenciación entre grupos
F_{CS}	Índice de diferenciación entre poblaciones dentro de los grupos.
COI	Gen mitocondrial que codifica para Citocromo c Oxidasa I
ADN	Ácido desoxirribonucleico
HCS	Sistema de Corrientes de HUmboldt
Cytb	Citocromo b
DNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfato
ENSO	El Niño-Oscilación del Sur
H	Diversidad haplotípica
k	Número de haplotipos
MCMC	Cadenas de Markov, método Monte Carlo
MgCl_2	Cloruro de Magnesio
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
nucADN	Ácido desoxirribonucleico nuclear
S	Número de sitios polimórficos
Taq	polimerasa de <i>Thermophyllus aquaticus</i>

RESUMEN

Los calamares pelágicos de los ecosistemas de plataforma continental, corresponden en su gran mayoría a especies oceánicas y migratorias de la familia Ommastrephidae, y las especies neríticas de la familia Loliginidae. Estas dos familias se caracterizan por estrategias de historia de vida contrastantes; así, las características diferenciales entre estos calamares son el desove bentónico y menor capacidad de natación de los loliginidos, mientras que los omastréfidos se caracterizan por su desove oceánico y un mayor potencial de dispersión. Entonces, las especies pelágicas de calamares que presentan distintas historias de vida deberían mostrar pautas diferenciales en la estructuración espacial de la diversidad genética. Para este estudio las especies modelo en el sistema de corrientes de Humboldt son los calamares *Dosidicus gigas* (Ommastrephidae) y *Doryteuthis gahi* (Loliginidae). El sistema de corrientes de Humboldt es un sitio exclusivo de estudio, porque es uno de los ecosistemas más productivos del planeta y está expuesto constantemente a cambios ambientales que provocan importantes fluctuaciones en las poblaciones marinas a diferentes escalas temporales (e.g., estacionales, interanuales, interdecadales). Para determinar la estructura poblacional y diversidad genética de ambas especies de calamares se colectaron 30 ejemplares de diferentes sitios en el sistema de corrientes de Humboldt (Perú-Chile), para obtener secuencias del gen mitocondrial COI. Así, para cada especie se calculó la diversidad genética, tamaño efectivo y se realizaron los análisis estadísticos pertinentes para determinar si existe una estructuración poblacional. De esta manera se

ha encontrado que las distintas historias de vida de cada especie afectan los patrones de estructuración y diversidad genética en el sistema de corrientes de Humboldt. En el caso de *D. gigas* no se encontró estructuración espacial; mientras que *D. gahi* se encuentra estructurado en dos unidades poblacionales, una que corresponde a los ejemplares capturados en Perú y la otra de los colectados en Chile. La diversidad genética de *D. gigas* fue baja en todas las localidades estudiadas y los test de neutralidad negativos y significativos, sugiriendo un evento demográfico pasado. En el caso de *D. gahi* la diversidad genética fue baja en Perú y alta en Chile. Finalmente, los análisis de inferencia bayesiana para estimar el tamaño poblacional en el tiempo muestran una expansión reciente (30000 – 40000 años) tanto de *D. gigas* como de la población peruana de *D. gahi*, pero en la población de *D. gahi* de Chile se mantiene constante en los últimos 130000 años.

ABSTRACT

Dosidiscus gigas (Ommastrephidae) and *Doryteuthis gahi* (Loliginidae) correspond to the most abundant pelagic squids in the Humboldt Current System (HCS). These species are characterized by contrasting life histories related to spawning and migration behaviours. To determine the population structure and genetic diversity of both species, we collected specimens from different sites in the HCS, and amplified a fragment of the mitochondrial gene Cytochrome c Oxidase I (COI). Molecular analyses in *D. gigas* showed low genetic diversity, absence of population structure and evidence of demographic expansion after the last glacial maximum (LGM). These results suggest that *D. gigas* conforms a single large population characterized by high levels of gene flow along the HCS. For *D. gahi*, COI sequences revealed the presence of two population units in the HCS corresponding to Central Chile and Peru. In the Peruvian unit we detected lower genetic diversity and evidence of demographic expansion corresponding to a date similar to that of *D. gigas*. The Chilean unit exhibited higher levels of diversity, suggesting that it corresponds to an older and stable population. According to these results, we propose that the Peruvian unit of *D. gahi* may have originated from the Chilean population through a founder effect. Changes in distribution ranges and population sizes could be related in both cases to the variations in productivity at a millennium scale along the HCS. Contrasted dispersal and migration capacities of both species could explain the differences in their genetic population structure.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.- Estructura y diversidad genética poblacional

Las poblaciones son generalmente unidades heterogeneas; muchas de ellas están subdivididas o “estructuradas” geográficamente en poblaciones locales, que pueden estar aisladas o conectadas por intercambio genético (Awise 2000, Nunney 2001, Freeland 2005, Allendorf & Luikart 2007). En el caso de poblaciones marinas de diferentes taxa, la mayoría de las especies migratorias o con un gran potencial de dispersión no presentan estructuración espacial de la diversidad genética; mientras que las especies que tienen un potencial de dispersión reducido están constituidas en distintas unidades poblacionales (Bohonak 1999, Kinlan & Gaines 2003, Ward 2006). Así, determinar cuáles son los límites de las poblaciones naturales no es una tarea fácil y en las últimas décadas las herramientas moleculares han ayudado a identificar estas unidades para poder manejar y conservar los recursos naturales (Shaklee et al. 1999, Ward 2006, Freeland 2005, Allendorf & Luikart 2007).

La estructura genética en poblaciones marinas refleja la interacción de procesos históricos y contemporáneos ya sean ecológicos, demográficos, conductuales, genéticos, oceanográficos, climáticos y geológicos (ver Grosberg & Cunningham 2002, Dawson et al. 2006). Consecuentemente, muchos animales muestran estructuración espacial de la diversidad genética, pero los patrones de esta diferenciación varían considerablemente

entre especies (Ward 2006). Así, la medida en que las poblaciones están unidas por intercambio de larvas, reclutas, juveniles, o adultos es conocida como conectividad (Palumbi 2003). En los sistemas marinos los patrones de conectividad genética son el resultado de la interacción entre la intensidad de flujo génico, su asociación con la distancia geográfica y la continuidad espacial y temporal de las poblaciones (Thiel et al. 2007). Por lo tanto la estructura genética poblacional de los invertebrados marinos varía ampliamente entre especies y puede ser categorizada en (a) homogeneidad genética, (b) aislamiento por distancia, (c) quiebres genéticos abruptos, y (d) parches caóticos (Grosberg & Cunningham 2002, Ward 2006, Thiel et al. 2007). Estudios sobre la conectividad de las poblaciones marinas sugieren que las especies con estados planctónicos mantienen homogeneidad genética, mientras que poblaciones con dispersión limitada tienen fuerte estructuración genética a pequeñas escalas espaciales (Palumbi 2003, Ward 2006, Collin et al. 2007, Thiel et al. 2007). Asimismo el período de duración de los estados planctónicos puede influenciar la estructura genética de las poblaciones marinas (Dawson et al. 2006). Por lo tanto, las distintas estrategias de historia de vida, también tienen importantes influencias en los patrones genéticos (estructura y diversidad). Por ejemplo, algunas especies de peces de arrecifes de coral muestran diferencias en estructura y diversidad genética relacionadas con sus estrategias reproductivas (huevos pelágicos o bentónicos) y preferencias de hábitat (Fauvelot et al. 2003). También un patrón interesante en este contexto son las relaciones entre rasgos de historia de vida (e.g., migraciones, desove, madurez) y rasgos genéticos (e.g., estructura y diversidad), reportados por Waples et al. (2001) en siete especies de salmones. La

fuerza de esta relación puede reflejar: (1) una influencia común de factores ambientales en ambos rasgos; (2) efectos directos de la estructura genética poblacional sobre los rasgos de historia de vida; (3) influencia de los rasgos de historia de vida sobre la estructura genética o una combinación de estos factores (Waples et al. 2001). Igualmente, las diferentes estrategias de historia de vida relacionadas con procesos de dispersión pueden modificar la estructura genética de las poblaciones al disminuir o incrementar la conectividad entre poblaciones (Bohonak 1999, Ward 2006, Thiel et al. 2007).

1.2.- Los efectos del clima en la diversidad genética

La teoría de genética de poblaciones ha sido tradicionalmente dominada por modelos en los cuales el tamaño de las poblaciones es constante (Maruyama & Fuerst 1985a, Nunney 2001). Sin embargo, las poblaciones naturales son dinámicas y pueden pasar por dramáticos cambios en el tamaño poblacional (Nei et al. 1975; Maruyama & Fuerst 1985a, Freeland 2005). Las causas de las fluctuaciones en poblaciones naturales son complejas y pueden estar determinadas por un conjunto variado de procesos tanto directos como indirectos, sean bióticos como abióticos. En la actualidad, se acepta que la dinámica de las poblaciones naturales es mejor entendida asumiendo la interacción existente entre los factores endógenos (denso-dependientes) y los factores exógenos (denso-independientes) (Lima 1995, 2001, Pedraza-García & Cubillos 2008). Algunos de los factores exógenos como la Oscilación del Atlántico Norte (NAO) y El Niño Oscilación del Sur (ENSO) han mostrado tener un impacto en una variedad de procesos

ecológicos en sistemas marinos y terrestres a diferentes escalas espaciales y temporales (Stenseth et al. 2002, 2003). Sin embargo, poco se conoce sobre los efectos que pueda tener el clima sobre la diversidad genética de las poblaciones naturales (ver Grant & Bowen 2006). Por ejemplo, los bajos niveles de diversidad genética y sus variaciones geográficas en algunas poblaciones de peces marinos han sido explicados por eventos climáticos históricos que dejan huellas en el ADN (e.g., expansiones demográficas, cuellos de botellas, extinciones y recolonizaciones) (e.g., Grant & Bowen 1998, Lecomte et al. 2004, Hewitt 2004, Grant et al. 2006, Grant & Bowen 2006, Dawson et al. 2006).

Así, desde el punto de vista de la genética de poblaciones, las especies que se ven sometidas a drásticas variaciones en sus tamaños poblacionales (cuellos de botella demográficos), deberían mostrar bajos niveles de diversidad genética (Slatkin 1977, McArdle & Gaston 1993). Esto debido a que cuando una población pasa por un cuello de botella, la variabilidad genética de la población declina rápidamente; mientras el tamaño de la población crece en tiempo ecológico, la diversidad genética se incrementa en tiempo evolutivo (Nei et al. 1975, Maruyama & Fuerst 1984). Esta disminución en la variabilidad genética también depende del tamaño del cuello de botella (Nei et al. 1975). Cuando el tamaño efectivo poblacional (N_e) es varios órdenes de magnitud menor al tamaño real de la población (N), probablemente se debe a cuellos de botella poblacionales, extinciones locales y recolonizaciones, o varianza en el éxito reproductivo (Avice 2000, Grosberg & Cunningham 2003). De todos estos factores que afectan el tamaño efectivo, ninguno es más importante que las fluctuaciones en el

tamaño actual de las poblaciones (Gillespie 1998, Freeland 2005). Además de los cuellos de botella, también los bajos niveles de diversidad genética observada pueden deberse a orígenes recientes (efectos fundadores) y las consecuencias de ambos procesos pueden ser idénticos pero son visualizados distintamente en la coalescencia (Rosenberg & Nordborg 2002) ya que las expansiones poblacionales antiguas muestran una estructura de la genealogía distinta a aquella observada en poblaciones que han pasado por procesos de extinción y recolonización (Grant & Bowen 1998). Esto debido a que antes del cuello de botella el largo de las ramas de la genealogía son mayores que después del cuello de botella, porque el largo de las ramas esta correlacionado con el número de mutaciones (Ramakrishnan et al. 2005). Así a través de la coalescencia se pueden estimar el tamaño efectivo poblacional (N_e), como también su cambio en el tiempo, suministrando información acerca de la historia demográfica de la población (Strimmer & Pybus 2001, Drummond et al. 2005). Además se puede distinguir un cuello de botella de una expansión demográfica a través de la distribución de diferencias entre pares de secuencias (Rogers & Harpending 1992) o explorando como el tamaño efectivo ha cambiado en tiempos pasados (Strimmer & Pybus 2001, Drummond et al. 2005). También el análisis de haplotipos de las secuencias de ADN mitocondrial puede ayudar a reconocer cuales son los procesos que pueden explicar la diversidad genética actual de las poblaciones naturales analizando índices de diversidad genética (Grant & Bowen 1998).

Combinando las señales de la diversidad genética (h), el tamaño efectivo poblacional (N_e) y la topología de la genealogía, se puede tener una idea más precisa de

los eventos históricos por los que ha pasado una población. Así las poblaciones que han pasado por un cuello de botella antiguo deberían presentar un tamaño efectivo mucho menor al tamaño real de la población (Gillespie 1998, Avise 2000) y además poseer una baja diversidad genética (Grant & Bowen 1998). Sin embargo, datos recientes sugieren que, incluso a corto plazo, sin tener en cuenta los acontecimientos históricos, la diversidad genética puede disminuir debido a la sobre pesca (Hauser et al. 2002, Gómez-Uchida & Banks 2006).

Las características de historia de vida de los organismos pueden alterar drásticamente los patrones de conectividad entre poblaciones y consecuentemente la estructura genética. Secundariamente, considerando que las poblaciones naturales varían en abundancia por una interacción de factores tanto endógenos como exógenos en una escala ecológica, las variaciones en el clima a gran escala (miles de años) pueden producir distintos patrones en la diversidad genética dependiendo de características de distribución espacial, uso de hábitat y rasgos de historia de vida.

1.3.- Sistema de estudio

El sistema de corrientes de Humboldt (HCS) es el ecosistema marino más productivo del planeta, y se extiende a lo largo de la costa oeste de Sudamérica desde el sur de Chile (c.a. $\sim 42^{\circ}\text{S}$) hasta las Islas Galápagos cercanas al Ecuador (Thiel et al. 2007). Oceanográficamente se caracteriza por un flujo predominante hacia el norte de aguas de origen subantártico y por surgencias costeras locales que incrementan la productividad

primaria (Montecino et al. 2005, Thiel et al. 2007). Eventos climáticos de diferentes escalas, El Niño Oscilación del Sur (ENSO), Oscilación Decadal del Pacífico (ODP) modifican drásticamente las surgencias costeras y consecuentemente la productividad primaria produciendo fuertes fluctuaciones en la biomasa de las poblaciones de peces pelágicos que son recursos pesqueros en Chile y Perú (Yáñez et al. 2001, 2003, Montecino et al. 2005, Thiel et al. 2007, Montecino & Lange 2009) (Figura 1.1). El origen de HCS aparentemente se relaciona con una serie de eventos de gran escala durante el Terciario, y antes de su instalación las costas de Chile habrían estado dominadas por una fauna de carácter subtropical en un ambiente mucho más cálido que el actual (Camus 2001). Desde su origen hasta la actualidad han ocurrido varios cambios oceanográficos importantes y de diferentes escalas espaciales y temporales como por ejemplo el incremento de la temperatura superficial del mar y de la productividad (Montecino & Lange 2009) que podrían verse reflejados actualmente en la diversidad genética de las poblaciones de animales marinos y en las variaciones temporales del tamaño efectivo poblacional.

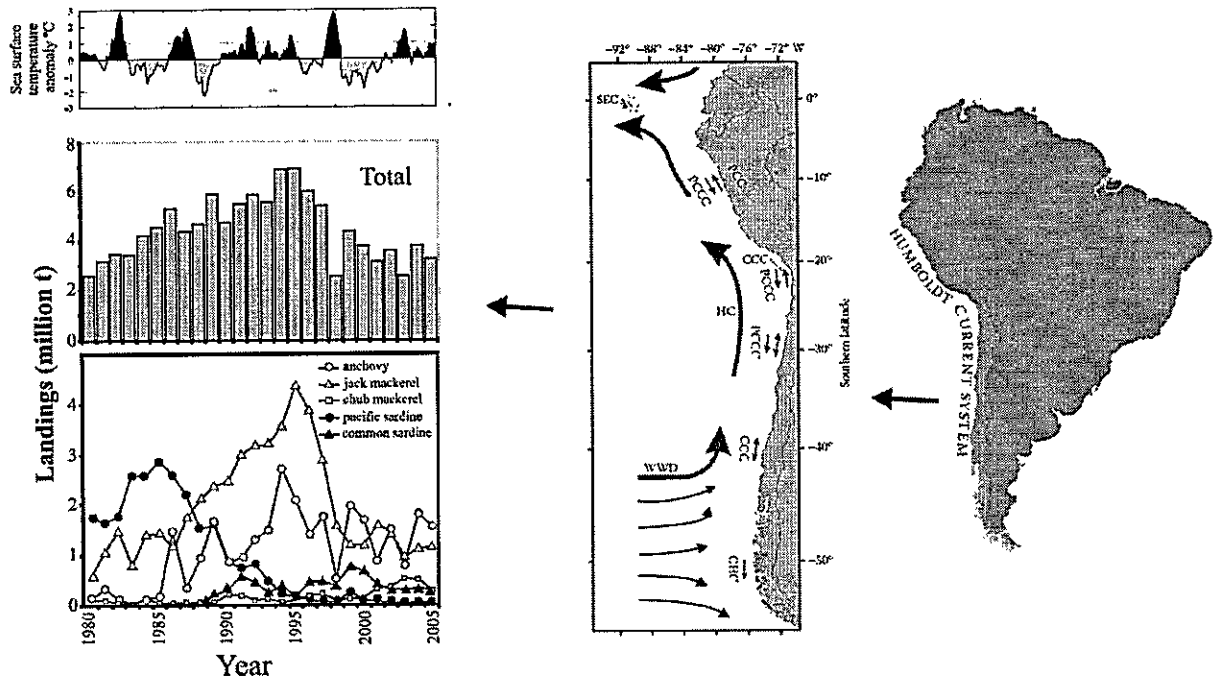


Figura 1.1 Sistema de Corrientes de Humboldt (modificado de Thiel et al. 2007).

En el sistema de corrientes de Humboldt se han reportado varios taxa de invertebrados con patrones de homogeneidad genética, debido a que poseen larvas planctónicas que viven varias semanas en la columna de agua, tal es el caso de el cangrejo *Cancer setosus*, el gastrópodo *Concholepas concholepas* y el bivalvo *Mesodesma donacium* (Gómez-Uchida et al. 2003; Cárdenas et al. 2009a, Thiel et al. 2007). Un patrón similar de homogeneidad genética se ha observado en peces que tienen un amplio rango geográfico como la merluza común *Merluccius gayi gayi* y el jurel *Trachurus murphyi* (Galleguillos et al. 2000; Cárdenas et al. 2009b). Contrariamente, las algas *Lessonia nigrescens* y *Mazaella laminarioides* y los moluscos *Chorus giganteus* y *Argopecten purpuratus* poseen una marcada estructuración poblacional asociada a su

bajo potencial de dispersión (Faugeron et al. 2001; Gajardo et al. 2002; Faugeron et al. 2005).

Las características únicas de HCS y los antecedentes sobre la estructura genética de algunos organismos característicos de este medio lo hacen un sistema de estudio interesante para investigar las variaciones genéticas de animales con distintas estrategias de historia de vida.

Los cambios oceanográficos relacionados con los eventos de glaciación (e.g., temperatura, salinidad, productividad, nivel del mar) en HCS podrían haber afectado distintivamente las poblaciones marinas dependiendo del uso del hábitat y patrón de distribución espacial. Las especies marinas costeras conseguirían encontrar ciertos refugios durante las glaciaciones, tal como se he registrado en el hemisferio norte (Hewitt 2004, Bennett & Provan 2008, Marko et al. 2010) y haber re-colonizado los sitios en donde existió extinción local. Estos procesos de extinciones y recolonizaciones en especies costeras marinas, que presentan una distribución espacial tipo metapoblaciones, favorecen la mezcla de demes locales que portan distintos genotipos influenciando diversidad genética post-eventos de glaciación (Fig. 1.2). Este patrón se ha encontrado en diversas especies marinas costeras de vertebrados e invertebrados (Lecomte et al. 2004, Dawson et al. 2001, Marko et al. 2010).

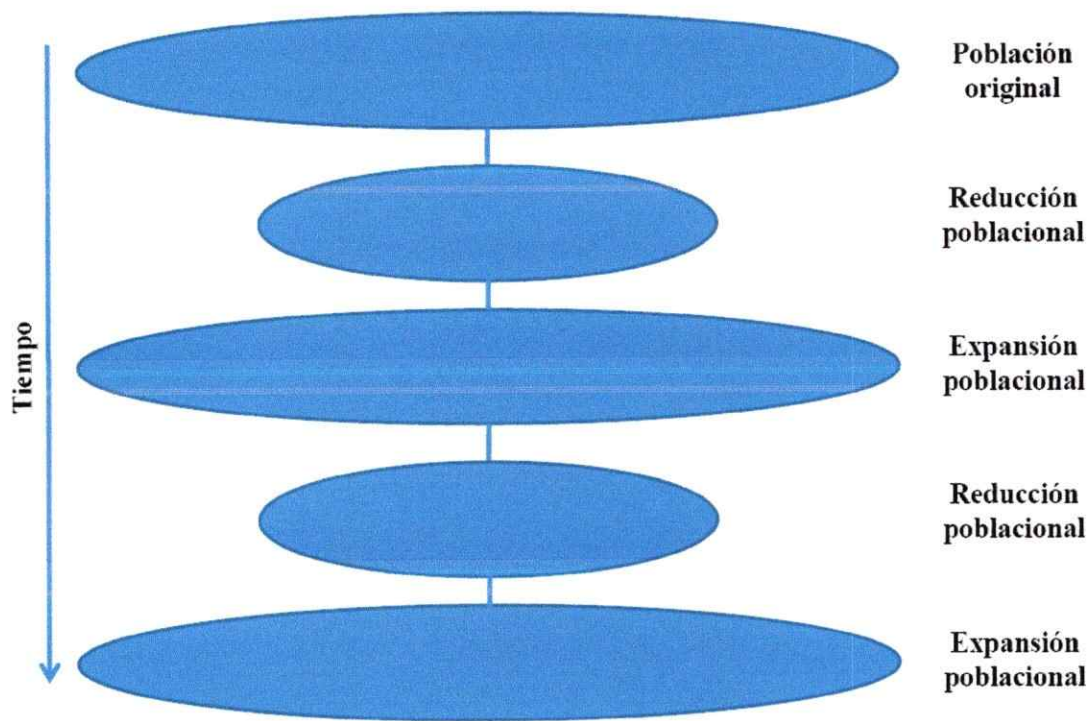


Figura 1.3 Modelo poblacional en el cual una población enorme y ampliamente distribuida pasa por reducciones y expansiones poblacionales. El tamaño de las elipses representan el tamaño poblacional (original del autor).

1.4.- Modelos de estudio

Las poblaciones de cefalópodos poseen dramáticas fluctuaciones inter-anales en su abundancia, atribuido a un crecimiento acelerado, maduración temprana, alta fecundidad, escasa sobre-posición de generaciones, vida corta, y presentan una alta variabilidad en sus estrategias de historia de vida (Boyle & Boletzky 1996, Boyle & Rodhouse 2005). Además, sus patrones migratorios, tamaño poblacional y distribución

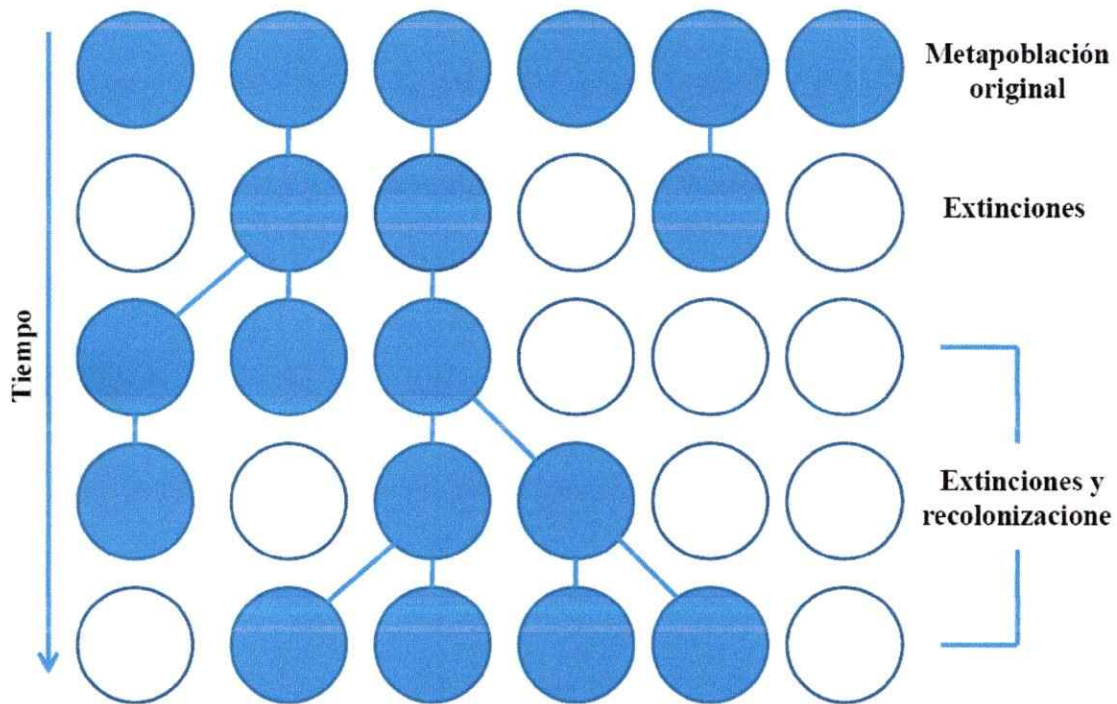


Figura 1.2 Modelo metapoblacional en el cual las poblaciones locales pasan por distintos procesos de extinción y re-colonización. Los círculos azules representan los sitios ocupados y los blancos las poblaciones extintas (modificado de Freeland 2005).

Contrariamente, las especies oceánicas de amplia distribución podrían haber experimentado cambios en los patrones de distribución y abundancia consecuencia de los cambios oceanográficos asociados a los eventos glaciales que podrían favorecer la colonización por medio de eventos fundadores seguidos de rápido crecimiento poblacional (Hewitt 2000) (Fig. 1.3). Estos eventos generalmente muestran una disminuida diversidad genética en las poblaciones actuales (Hewitt 2000, 2004).

geográfica son particularmente susceptibles a cambios en las condiciones oceanográficas (Anderson & Rodhouse 2001, Boyle & Rodhouse 2005, Dawe et al. 2007, Semmens et al. 2007).

Globalmente, la fauna de calamares pelágicos de la mayoría de los ecosistemas de plataforma continental esta dominado por especies de las familias Ommastrephidae (Suborden Oegopsina) y Loliginidae (Suborden Myopsina) (Dawe et al. 2007). Una gran parte de las especies de calamares que habitan en el océano Pacífico tienen una amplia distribución geográfica dentro de este océano, e incluso se distribuyen en otros océanos del mundo (Roper et al. 1985; Rocha 1997, Ibáñez et al. 2009). No obstante, en el sistema de corrientes de Humboldt, algunas especies de calamares presentan diferencias poblacionales ya sean en la morfometría como genética (Vega et al. 2002; Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). Así la mayoría de las especies de calamares omastréfidos muestran estructuración genética a grandes escalas espaciales (e.g., Brierley et al. 1993, Katugin 2002, Triantafillos et al. 2004, Sandoval-Castellanos et al. 2007) otras revelan una ausencia o débil estructura genética poblacional entre sitios cercanos (c.a. 600 km, Adcock et al. 1999, Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). De la misma manera, los calamares loliginidos presentan una marcada heterogeneidad y/o homogeneidad genética dependiendo de la escala espacial (e.g., Carvalho & Loney 1989, Brierley et al. 1995, Reichow & Smith 2001, Herke & Foltz 2002, Shaw et al. 2002, 2004, Buresch et al. 2006, Aoki et al. 2008, Shaw et al. 2010), pero a diferencia de los omastréfidos los calamares loliginidos son neríticos y están más influenciados por procesos locales como

son las desembocaduras de grandes ríos, los que funcionan como barreras al flujo genético (Herke & Foltz 2002, Semmens et al. 2007).

Para este estudio las especies modelo en el sistema de corrientes de Humboldt son el calamar *Dosidicus gigas* (d' Orbigny 1835) (Suborden Oegopsina, Familia Ommastrephidae), especie que habita tanto en aguas oceánicas como neríticas y desde la superficie hasta los 1200 m en la región este del océano Pacífico desde Alaska hasta el sur de Chile (Keyl et al. 2008, Figura 1.4).

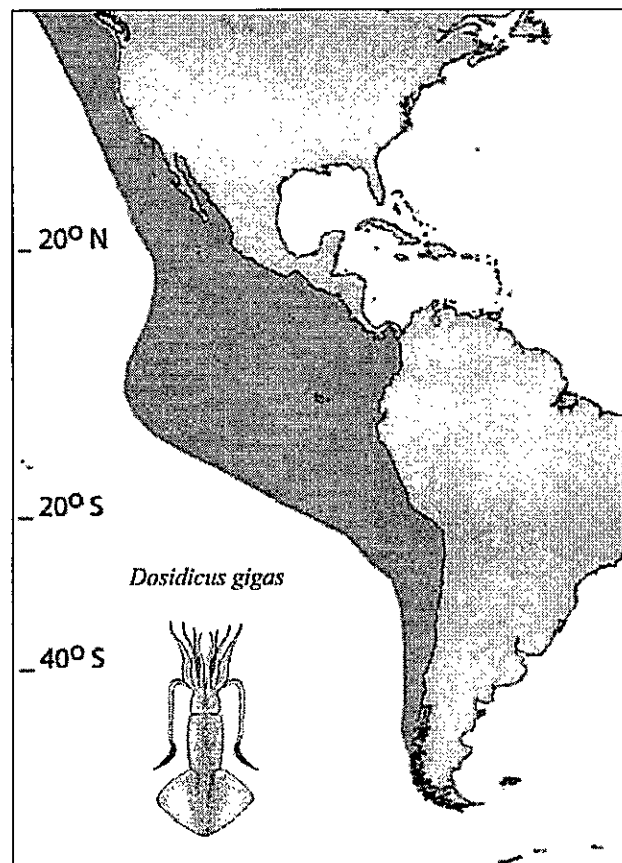


Figura 1.4 Rango geográfico del calamar *Dosidicus gigas* (modificado de Boyle & Rodhouse 2005).

En contraste el calamar *Doryteuthis (Amerigo) gahi* (d' Orbigny 1835) (Suborden Myopsina, Familia Loliginidae), es una especie nerítica que ocurre desde la superficie hasta profundidades de 350 m, y se distribuye desde el norte de Perú hasta las Islas Falkland (Roper et al. 1984; Boyle & Rodhouse 2005, Figura 1.5).

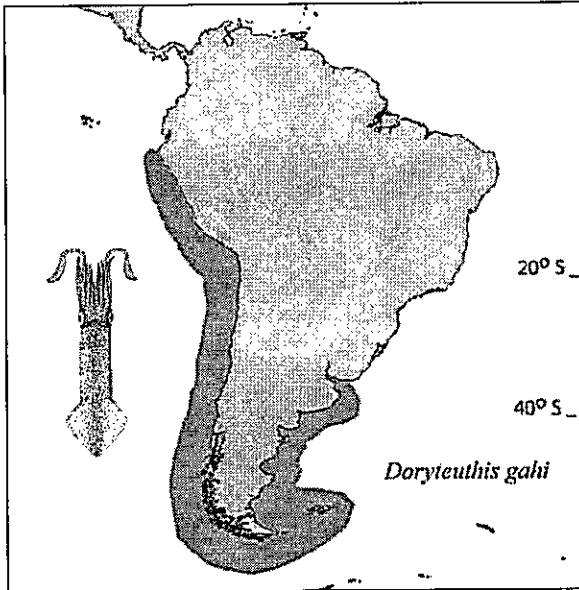


Figura 1.5 Rango geográfico del calamar *Doryteuthis gahi* (modificado de Boyle & Rodhouse 2005).

Estas especies de calamares son las más abundantes en el sistema de corrientes de Humboldt constituyendo recursos pesqueros en Perú y Chile (Cardoso 1991; Rocha & Vega 2003). Ambas especies exhiben contrastantes estrategias de historia de vida (Tabla 1.1). El calamar *Dosidicus gigas* posee un desove múltiple cerca de la superficie (Rocha et al. 2001; Nigmatullin et al. 2001; Staaf et al. 2008), mientras que *D. gahi* tiene un desove intermitente terminal, poniendo sus huevos adheridos al fondo marino

(Cardoso et al. 1998; Cardoso et al. 2005) (Figura 1.6). Además existen otras diferencias: *D. gigas* es de mayor tamaño corporal (100 cm longitud del manto y 50 kg de peso), alcanzando velocidades de 25 km/h, poseen una fecundidad de hasta 32 millones de ovocitos y más (Nigmatullin & Markaida 2009), y paralarvas de 10 mm que se desarrollan en 2 a 3 semanas, recorriendo 100 a 200 km en ese periodo (Nigmatullin et al. 2001; Gilly et al. 2006). Contrariamente, *D. gahi* alcanza un menor tamaño (35 cm longitud del manto y 250 g de peso), una fecundidad de hasta 11500 ovocitos, y paralarvas de 3 mm que se desarrollan en 20 días (Arkhipkin et al. 2000; Villegas 2001; Cardoso et al. 2005). La clave de las diferencias entre estos calamares omastreídeos y loliginídeos que determinan las estrategias de historia de vida son el desove bentónico y menor capacidad de natación de los loliginídeos (O' Dor & Webber 1991). Un esquema resumido de las diferencias en la ontogénesis de los calamares se puede apreciar en la Figura 1.6 (Arkhipkin, comunicación personal mayo 2010). En estas figuras se puede apreciar las migraciones verticales diarias (*D. gigas*) y estacionales (*D. gahi*), su tipo de desove y el hábitat que ocupan durante las diferentes etapas de su vida (Figura 1.6).

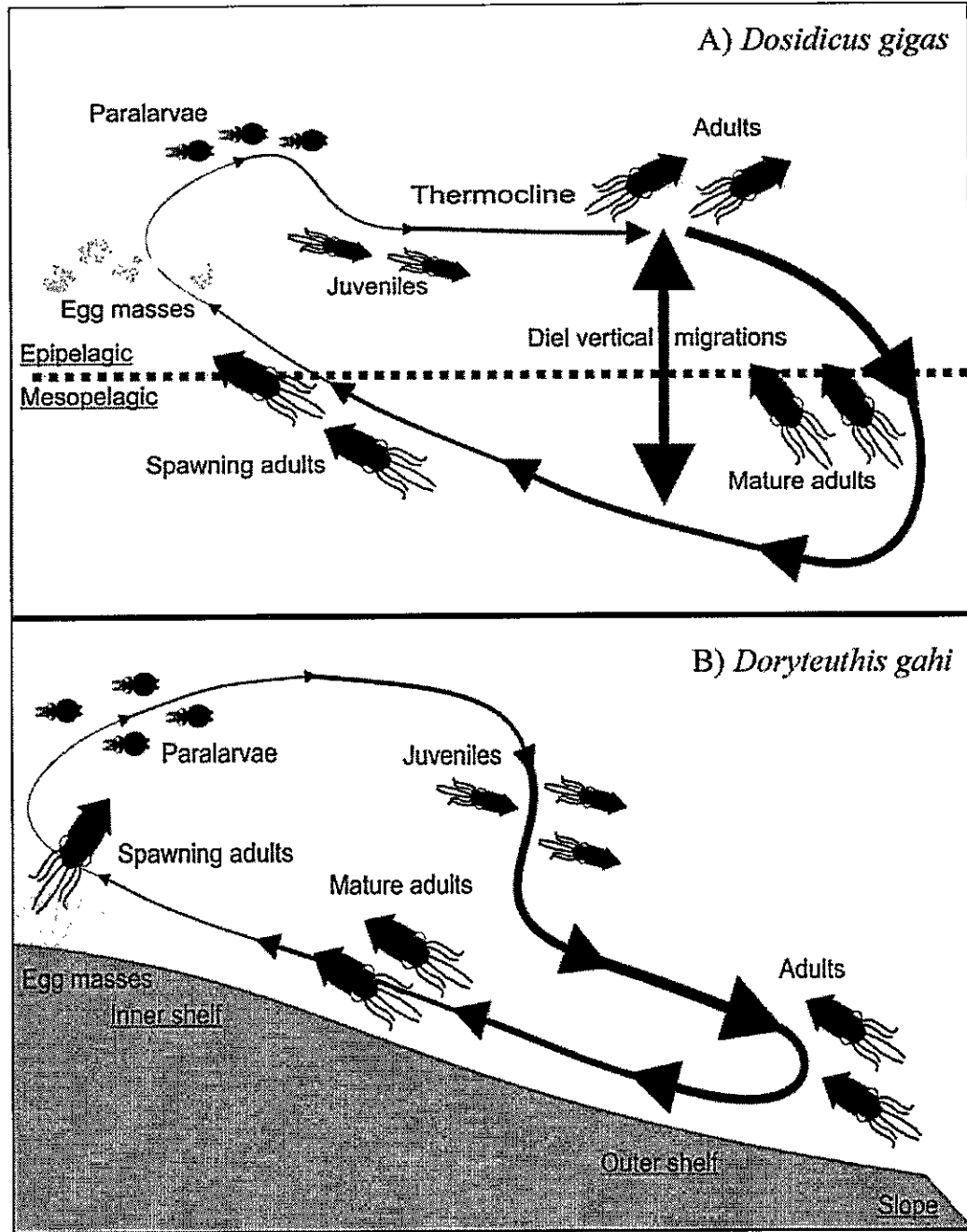


Figura 1.6 Esquema resumido de la ontogénesis de los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* modificado de Arkhipkin (comunicación personal).

Tabla 1.1 Comparación de las características de historia de vida de los calamares *D. gigas* y *D. gahi*.

	<i>Dosidicus gigas</i>	<i>Doryteuthis gahi</i>
Longitud del manto (cm)	100	35
Peso (kg)	50	0,25
Tipo de desove	Pelágico	Bentónico
Fecundidad	32000000	11500
Tamaño paralarvas (cm)	0,1	0,03
Tiempo desarrollo (días)	21	21
Migraciones (Km)	1000s	100s
Edad (meses)	15	12

Las estadísticas pesqueras de estas especies en los últimos 30 años en Chile y Perú muestran congruencia en cuanto a la periodicidad de los máximos y mínimos desembarques, pero en diferentes órdenes de magnitud (Figura 1.7). Estos patrones de desembarques fluctuantes son coincidentes con las variaciones en las anomalías térmicas del mar y por tal razón se ha interpretado que las poblaciones de calamares varían su biomasa en respuesta a las fluctuantes condiciones ambientales que ocurren en diferentes escalas temporales en el sistema de corrientes de Humboldt (e.g., Anderson & Rodhouse 2001). A pesar de que las fluctuaciones en las capturas no son representativas de la abundancia real de las poblaciones de calamares, sus variaciones están relacionadas con procesos biológicos asociados a los periodos reproductivos y el reclutamiento (Zúñiga et al. 2008), por lo tanto pueden servir para inferir indirectamente los cambios inter-
anuales de la biomasa de las especies de calamares objetivos de pesca. Así entonces se

ha postulado, tanto en Chile como en Perú, que las condiciones ambientales especialmente los eventos de El Niño y La Niña juegan un rol importante en la abundancia de *D. gigas* y *D. gahi*. Precisamente un evento El Niño, con aumento de temperatura del mar, coincide con la disminución en las capturas de estos calamares; mientras que La Niña con bajas temperaturas del mar, concuerdan con un incremento en las capturas (Villegas 2001; Rodhouse 2001; Anderson & Rodhouse 2001; Taipe et al. 2001; Rocha & Vega 2003, Waluda et al. 2004, Waluda & Rodhouse 2006). Estas variaciones inter-anales relacionadas con los eventos ENSO es consistente con los altos volúmenes de desembarques de *D. gigas* en Perú y Chile, observados en 1992, que disminuyeron hasta desaparecer el stock en 1998, posiblemente debido a los cambios ambientales causados por el evento EL Niño 1997-1998 (Rocha & Vega 2003). En la última década se ha observado un fuerte incremento desde el 2001 al presente (Ibáñez & Cubillos 2007) alcanzando niveles de 296953 t en el 2005, tal vez asociado al evento de La Niña 2000-2001. Este incremento muestra una periodicidad sincrónica estacional (Zúñiga et al. 2008) que concuerda con los patrones estacionales de estructura de tamaños (Chong et al. 2005; Ibáñez & Cubillos 2007). Un análisis exploratorio de las series de tiempo en ambas especies de calamares manifiesta dinámicas poblacionales muy distintas (Ibáñez, datos no publicados). En el caso de *D. gahi* se aprecia que los cambios temporales (Figura 1.7) no son tan agudos y este patrón podría dar cuenta de una dinámica poblacional más persistente. De la misma forma, en el hemisferio norte se han registrado respuestas poblacionales opuestas frente a las mismas variaciones oceanográficas (NAO) en dos especies distintas de calamares (Omastreído versus

Loliginido) (Dawe et al. 2007). A pesar de todos estos antecedentes, actualmente se sugiere que los eventos asociados al clima (e.g., El Niño y La Niña) podrían causar un cambio en la distribución (tanto horizontal como vertical) más que un decrecimiento en el tamaño poblacional (Semmens et al. 2007). Estos cambios en el rango geográfico asociados a los patrones migratorios de los calamares se han descrito como “invasiones” o “expansiones poblacionales” en ambos hemisferios del Océano Pacífico (Zeiberg & Robinson 2007, Field et al. 2007).

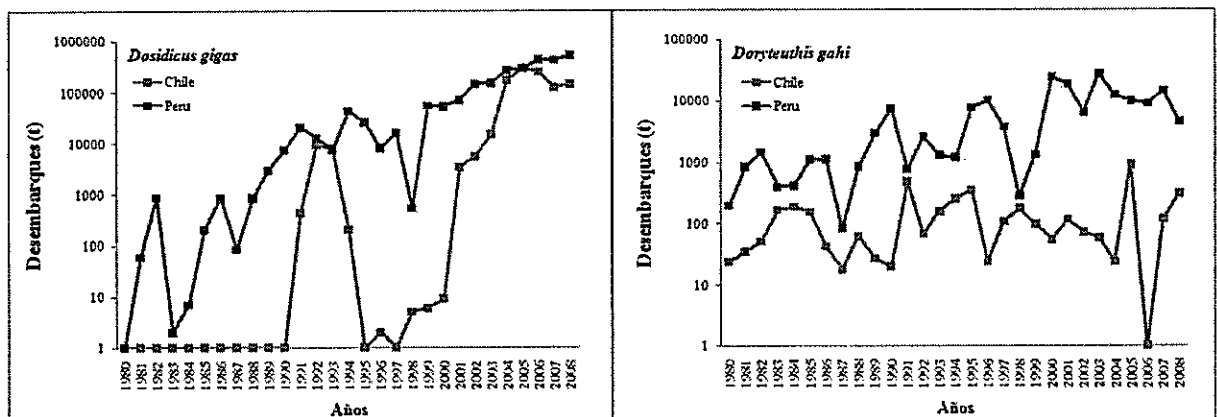


Figura 1.7 Desembarques de *D. gigas* y *D. gahi* en Perú y Chile (Fuente FAO).

Entonces dadas las diferencias entre *D. gigas* y *D. gahi*, en términos de historia de vida, es muy probable que no muestren un patrón similar de estructura genética en el sistema de corrientes de Humboldt, ya que en el rango geográfico de distribución latitudinal de *D. gigas*, se han distinguido tres poblaciones que se pueden sobreponer, diferenciándose entre sí en el tamaño corporal, tamaño de madurez sexual, período de desove, y distribución de la abundancia (Nigmatullin et al. 2001). En Perú se han

reconocido dos sub-poblaciones de *D. gigas*, una caracterizada por ejemplares pequeños que maduran temprano y otra por ejemplares grandes que maduran tarde (Argüelles et al., 2001; Taipe et al. 2001; Tafur et al. 2001). En cambio Ibáñez & Cubillos (2007), basándose en la estructura de tamaños, sugieren que existiría una población local en Chile centro-sur, la que presentaría una limitada migración de individuos con la población del Perú basándose en su fauna parasitaria (Pardo-Gandarillas et al. 2009). Además, se ha propuesto que las poblaciones de *D. gigas* de California-México y Chile-Perú corresponden a dos grupos distintos (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). En el caso de *D. gahi* se han encontrado diferencias morfométricas entre individuos de Chile y Perú (Vega et al. 2002) y de acuerdo a las tasas de crecimiento, Villegas (2001) indica que podrían existir dos sub-poblaciones en aguas Peruanas.

En el Atlántico suroeste y Pacífico sureste *D. gahi* presenta altos valores de diversidad genética ($H_o = 0,87$), estimada con microsatélites de ADN (Shaw et al. 2004). En cambio en el océano Pacífico *D. gigas* muestra niveles mucho más bajos de diversidad genética (0,23 con RAPDs y 0,37 ADNmt) (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). A pesar de que la diversidad genética de estas especies de calamares no es comparable debido a que se han estimado con diferentes marcadores moleculares, son los únicos antecedentes que se tienen de ambas especies y pueden ayudar a proponer hipótesis sobre los mecanismos que producen estos patrones. Así los bajos niveles de diversidad genética en animales marinos son inusuales y generalmente ocurren en poblaciones que han pasado por drásticas reducciones en el tamaño poblacional, cuellos de botella o eventos fundadores y que están en procesos de expansión demográfica

(Grant & Bowen 1998; Carvalho & Nigmatullin 1998; Hoelzel 1999; Freeland 2005). Entonces es posible que las grandes poblaciones de calamares existentes representan expansiones relativamente recientes, y que la diversidad genética todavía no ha alcanzado nuevos niveles de equilibrio (Carvalho & Nigmatullin 1998).

En este estudio se comparan dos especies de calamares con distintas estrategias de historia de vida en el Sistema de Corrientes de Humboldt. Las contrastantes historias de vida de estas dos especies de cefalópodos debieran tener una importante influencia en los patrones de estructura y diversidad genética.

Objetivo general:

Evaluar si las historias de vida contrastantes de los calamares *D. gigas* y *D. gahi* se asocian a diferencias en la estructura genética poblacional, la diversidad genética e historia demográfica de ambas especies en el sistema de corrientes de Humboldt.

Objetivos específicos:

- 1 Caracterizar la diversidad genética de los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* provenientes de distintos sitios en el sistema de corrientes de Humboldt (Perú-Chile) mediante el marcador molecular Citocromo c Oxidasa I.
- 2 Determinar si existe estructuración genética poblacional en cada especie de calamar en el sistema de corrientes de Humboldt (Perú-Chile) mediante el marcador molecular Citocromo c Oxidasa I.
- 3 Inferir la historia demográfica de los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* en el sistema de corrientes de Humboldt (Perú-Chile) utilizando el marcador molecular Citocromo c Oxidasa I.

Hipótesis general:

Las diferencias de estrategias de historia de vida entre distintas especies de calamares influyen los patrones de diversidad genética y de estructuración poblacional.

Hipótesis específica 1:

“Los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* deberían presentar patrones distintivos de estructura genética espacial en el Sistema de Corrientes de Humboldt, dadas sus estrategias de historia de vida diferenciales (e.g., tamaño corporal, tipo de desove, potencial de dispersión)”.

Predicción 1: La especie *D. gigas* exhibiría una ausencia de estructuración genética poblacional consecuencia de sus grandes migraciones y desove pelágico.

Predicción 2: En la especie *D. gahi* se debiera encontrar una estructuración genética poblacional asociada a su menor capacidad migratoria y desove bentónico.

Hipótesis específica 2:

“Durante el Pleistoceno tardío, la alternancia de periodos glaciales e interglaciales en el Sistema de Corrientes de Humboldt estarían asociado a cambios en los patrones de distribución y abundancia de ambas especies de calamares (*D. gigas* y *D. gahi*). Sin embargo, las características de historia de vida contrastantes de estas especies y su utilización diferencial de hábitat determinarían que tipo de proceso demográfico pasado habría ocurrido”.

Predicción 1: Si los cambios oceanográficos asociado al último ciclo glacial han

afectado la distribución y abundancia de los calamares en el HCS, ambas especies deberían exhibir una baja diversidad genética.

Predicción 2: Las diferencias en historia de vida y hábitat de *D. gahi* y *D. gigas* estarían asociadas a respuestas demográficas distintas en ambas especies, frentes a los cambios ligados a la última transición glaciario-interglaciario.

Referencias

- Adcock G.J., P.W. Shaw, P. G. Rodhouse & GR. Carvalho. 1999. Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* during a period of intensive fishing. Marine Ecology progress Series 187: 171-178.
- Allendorf F.W. & G. Luikart. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, 642 pp.
- Anderson C.I.H. & P. Rodhouse. 2001. Life cycles, oceanography and variability: ommastrephid squid in variable oceanographic environments. Fisheries Research 54: 133-143.
- Argüelles J., P.G. Rodhouse, P. Villegas & G. Castillo. 2001. Age, growth and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. Fisheries Research 54: 51-61.
- Arkhipkin A.I., Laptikhovsky V.V. & Middleton D.A.J. 2000. Adaptations for cold water spawning in loliginid squid: *Loligo gahi* in Falkland waters. Journal of Molluscan Studies 66: 551-564.
- Avice J.C. 2000. Phylogeography. Harvard University Press, Massachusetts, 446 pp.
- Bandelt H.J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.
- Bennett KD, J Provan. 2008. What do we mean by 'refugia'?. Quaternary Science Reviews 27: 2449-2455.
- Bohonak, A. J. 1999. Dispersal, gene flow and population structure. Quarterly Review

- of Biology 74: 21-45.
- Boyle P.R. & S.V. Boletzky 1996. Cephalopod populations: definition and dynamics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B. 351: 985-1002.
- Boyle P.R. 1990. Cephalopod biology in the fisheries context. Fisheries Research 8: 303-321.
- Boyle, P.R. & P. Rodhouse. 2005. Cephalopods. Ecology and fisheries. Blackwell Publishing, Oxford, 451 pp.
- Brierley A.S., Rodhouse P.G., Thorpe J.P., Clarke M.R. (1993) Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonian Shelf and the Antarctic Polar Frontal Zone. Marine Biology 116: 593-602.
- Brierley A.S., Thorpe J.P., Pierce G.J., Clarke M.R., Boyle P.R. (1995) Genetic variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginidae) in the northeast Atlantic Ocean. Marine Biology 122: 79-86.
- Buresch K. C., Gerlach G. & R. T. Hanlon. 2006. Multiple genetic stocks of longfin squid *Loligo pealeii* in the NW Atlantic: stocks segregate inshore in summer, but aggregate offshore in winter. Marine Ecology Progress Series 310: 263-270.
- Camus P.A. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. Revista Chilena de Historia Natural 74: 587-617.
- Cardoso F. 1991. Los calamares y potas (Cephalopoda: Teuthoidea) del mar peruano. Biota 15: 2-13.

- Cardoso F., Baltazar P. & J. Bautista. 2005. The early development of the Patagonian squid *Loligo gahi* d'Orbigny, 1835 in Peruvian Waters (Cephalopoda: Loliginidae). *Revista Peruana de Biología* 12(3): 369- 376.
- Cardoso, F., J. Tarazona & C. Paredes 1998. Aspectos biológicos del calamar patagónico *Loligo gahi* (Cephalopoda: Loliginidae) en Huarmey, Perú. *Revista Peruana de Biología* 5: 9-14.
- Carvalho G.R. & Ch.M. Nigmatullin. 1998. Stock structure analysis and species identification. En: Squid recruitment dynamics. The genus *Illex* as a model. The commercial *Illex* species. Influences on variability. Rodhouse P.G., Dawe E.G. & O'Dor R.K. (eds.). FAO Fisheries Technical Paper 376: 199-232.
- Carvalho G.R. & K.H. Loney. 1989. Biochemical genetic studies on the Patagonian squid, *Loligo gahi* d'Orbigny. I. electrophoretic survey of genetic variability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126: 231-241.
- Carvalho G.R., Pitcher T.J. (1989) Biochemical genetic studies on the Patagonian squid *Loligo gahi* d'Orbigny. II. Population structure in Falkland waters using isozymes, morphometrics and life history data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126:243–258.
- Carvalho G.R., Thompson A., Stoner A.L. (1992) Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid, *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 158:105–121.
- Chong J., Oyarzún C., Galleguillos R., Tarifeño E., Sepúlveda R.D., Ibáñez C.M. 2005. Parámetros biológico-pesqueros de la jibia, *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835)

- (Cephalopoda: Ommastrephidae) frente a la costa de Chile central (29° S y 40° S) durante el periodo 1993-1994. *Gayana* 69 (2): 319-328.
- Dawe E.G., Hendrickson L.C., Colbourne E.B., Drinkwater K.F. & M.A. Showell. 2007. Ocean climate effects on the relative abundance of shortfinned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealeii*) squid in the northwest Atlantic Ocean. *Fisheries Oceanography* 16:4, 303–316.
- Dawson M.N., Waples R.S. & G. Bernardi. 2006. Phylogeography. In: L.G.D. Allen, D.J. Pondella & M.H. Horn (eds.). *The Ecology of Marine Fishes: California and Adjacent Waters*. University of California Press. pp 26-54.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B. & O.G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22(5): 1185-1192.
- Ehrhardt N., P. Jacquemin, F. García, G. González, J. Lopez, J. Ortiz & A. Solis. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, México. *FAO Fisheries Technical Paper*, 231: 306-340.
- Faugeron S., Martínez E.A., Correa J.A. & Billot C. 2005. Long-term copper mine waste disposal in northern Chile associated with gene flow disruption of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens*. *Marine Ecology Progress Series* 288: 129–140.
- Faugeron S., Valero M., Destombe C., Martinez E.A. & Correa J.A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37: 705–716.

- Fauvelot C. Bernardi G., & S. Planes. 2003. Reductions in the mitochondrial dna diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. *Evolution* 57(7): 1571–1583.
- Field JC, Baltz K, Phillips AJ, Walker WA (2007) Range expansion and trophic interactions of the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, in the California Current. *CalCOFI rep* 48:131-146
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Gajardo G., Cancino J.M. & Navarro J.M. 2002. Genetic variation and population structure in the marine snail *Chorus giganteus* (Gastropoda: Muricidae), an overexploited endemic resource from Chile. *Fisheries Research* 55: 329–333.
- Galleguillos, R., Troncoso, L., Oyarzún, C., Astorga, M. & Peñaloza, M. 2000. Genetic differentiation in Chilean hake *Merluccius gayi gayi* (Pisces: Merlucciidae). *Hydrobiologia* 420: 49–54.
- Gillespie J.H. 1998. *Population genetics*. The Johns Hopkins University Press, London. 174 pp.
- Gilly W.F., Elliger C.A., Salinas C.A., Camarilla-Coop S., Bazzino G., Beman M. 2006. Spawning by jumbo squid *Dosidicus gigas* in San Pedro Mártir Basin, Gulf of California, Mexico *Marine Ecology Progress Series* 313: 125–133.
- Gomez-Uchida, D., Weetman, D., Hauser, L., Galleguillos, R. & Retamal, M. 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. *Journal of Crustacean Biology* 23: 486–494.

- Gomez-Uchida, D. & M.A. Banks. 2006. Estimation of effective population size for the long-lived Darkblotched Rockfish *Sebastes crameri*. *Journal of Heredity* 97(6):603-606.
- Grant W.S. 2005. A second look at mitochondrial DNA variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*): assessing models of population structure and the Black Sea isolation hypothesis. *Genetica* 125:293-309.
- Grant W.S. & B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineage of marine fishes: insights for sardines and anchovies and lesson for conservation. *The Journal of Heredity* 89(5): 415-426.
- Grant W.S. & B.W. Bowen. 2006. Living in a tilted world: climate change and geography limit speciation in Old World anchovies (*Engraulis*; Engraulidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 673-689.
- Grant W.S., Spies I.B. & M.F. Canino. 2006. Biogeographic evidence for selection on mitochondrial DNA in North Pacific Walleye Pollock *Theragra chalcogramma*. *Journal of Heredity* 97(6): 571-580.
- Grosberg R.K. & C.W. Cunningham. 2001. Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: M.D. Bertness, S. Gaines, & M.E. Hay (eds.) *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp 61-84.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:11742-11747.

- Herke SW, Foltz DW (2002) Phylogeography of two squid (*Loligo pealei* and *L. plei*) in the Gulf of Mexico and northwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology* 140:103–115.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans Royal Soc B* 359:183–195
- Hoelzel A.R. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 23–39.
- Ibáñez C.M. & L.A. Cubillos. 2007. Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. *Scientia Marina* 71(1): 123-128.
- Ibáñez C.M., Camus P.A. & F. Rocha (2009) Diversity and distribution of cephalopod species of the coast off Chile. *Marine Biology Research* 5(4): 374-384.
- Keyl F, Argüelles J, Mariátegui L, Tafur R, Wolff M, Yamashiro C (2008) A hypothesis on range expansion and spatio-temporal shifts in size-at-maturity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the eastern Pacific Ocean. *CalCOFI Rep* 49:119-128.
- Pardo-Gandarillas M.C., Lohrmann K., A. Valdivia & Ibáñez C.M. 2009. First record and taxonomic description of parasites of *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from southeastern Pacific Ocean. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44: 397-408.

- Katugin ON (2002) Patterns of genetic variability and population structure in the North Pacific squids *Ommastrephes bartramii*, *Todarodes pacificus*, and *Beryteuthis magister*. *Bulletin of Marine Science* 71:383–420.
- Lecomte F., W.S. Grant, J.J. Dodson, R. Rodríguez-Sánchez & B.W. Bowen. 2004. Living with uncertainty: genetics imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology* 13: 2169-2182.
- Lima M. 1995. Regulación poblacional, denso-dependencia y métodos para su detección en series de tiempo. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 251-269.
- Lima M. 2001. The dynamics of natural populations: feedback structures in fluctuating environments. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 317-332.
- Mayurama T. & P.A. Fuerst. 1985a. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. III Genetic homoyigosity in population which experience periodic bottlenecks. *Genetics* 111: 691-703.
- Mayurama T. & P.A. Fuerst. 1985b. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II Number of alleles in small that was formed by a recent bottlenecks. *Genetics* 111: 675-689.
- McArdle B. & K. Gaston. 1993. The temporal variability of populations. *Oikos* 67: 187-191.
- Montecino V., Strub P.T., Chavez F.P., Thomas A.C., Tarazona J. & Baumgartner T. 2005. Chapter 10 Bio-physical interactions off western South America (6,E). In:

- The Sea*, A.R. Robinson & K.H. Brink (eds). Cambridge: Harvard University Press, 329–390.
- Montecino V, Lange CB (2009) The Humboldt Current System: ecosystem components and processes, fisheries, and sediment studies. *Prog Ocean* 83:65-79.
- Nei M, Mayurama T & Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Nigmatullin Ch.M., K.N. Nesis & A.I. Arkhipkin. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research* 54: 9-19.
- O' Dor R.K. & D.M. Webber. 1991. Invertebrates athletes: Tradeoffs between transport efficiency and power density in cephalopod evolution. *Journal of Experimental Biology* 160: 93-112.
- Palumbi S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13: 146-158.
- Pedraza-Gracia M. & L.A. Cubillos. 2007. Population dynamics of two small pelagic fish in the central-south area off Chile: delayed density-dependence and biological interaction. *Environmental Biology of Fishes* 82:2, 111-122.
- Poole R.W. 1974. *An introduction to quantitative ecology*. McGraw-Hill, New York.
- Ramakrishnan U., Hadly E.A. & J.L. Mountain. 2005. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. *Molecular Ecology* 14: 2915–2922.

- Reichow D, Smith MJ (2001) Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens*. *Molecular Ecology* 10:1101–1110.
- Rocha F. & M. A. Vega. 2003. Overview of cephalopod fisheries in Chilean waters. *Fisheries Research* 60: 151-159.
- Rocha F. 1997. Cephalopods in Chilean waters, a review. *Malacological Review* 30: 101-113.
- Rocha F., Guerra A. & González A.F. 2001. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Review* 76: 291-304.
- Rodhouse P.G. 2001. Managing and forecasting squid fisheries in variable environments. *Fisheries Research* 54: 3-8.
- Rogers A.R. & H.C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552-569.
- Roper C.F.E., M.J. Sweeney & C.E. Nauen. 1984. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries Synopsis. 125 (3), 277 pp.
- Rosenberg N.A. & M. Nordborg. 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Genetics Review* 3: 380-390.
- Sandoval-Castellanos E., Uribe-Alcocer M. & Díaz-Jaimes P. 2007. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fisheries Research* 83: 113–118.

- Sandoval-Castellanos E., Uribe-Alcocer M. & Díaz-Jaimes P. 2010. Population genetic structure of Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) inferred by mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 385: 73–78.
- Semmens J.M., Pecl G.T., Gillanders B.M., Waluda C.M., Shea E.K., Jouffre D., Ichii T. Zumholz K., Katugin O.N., Leporati S.C. & P.W. Shaw. 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Review in Fish Biology and Fisheries* 17:401–423.
- Shaklee J.B., Beacham T.D., Seeb L. & B.A. White. 1999. Managing fisheries using genetic data: case studies from four species of Pacific salmon. *Fisheries Research* 43: 45-78.
- Shaw P.W., G.J. Pierce & P.R. Boyle. 2004a. Subtle population structure within highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 407-417.
- Shaw PW, Adcock GJ, Burnett WJ, Carvalho GR, & AI Arkhipkin. 2004b. Temporally distinct spawning cohorts and geographically distinct spawning aggregations within the Patagonian squid *Loligo gahi* do not represent genetically differentiated sub-populations. *Marine Biology* 144:961–970
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the Veined Squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8:407–417.

- Shaw PW, Hendrickson L, McKeown LJ, Stonier T, Naud M-J, Sauer WHH (2010)
Discrete spawning aggregations of loliginid squid do not represent genetically
distinct populations. *Marine Ecology Progress Series* 408: 117–127
- Slatkin M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local
extinction. *Population Biology* 12: 253-262.
- Stenseth N.C., Mysterud A., Ottersen G., Hurrell J.W., Chan K-S. & M. Lima. 2002.
Ecological effects of climate fluctuations. *Science* 297, 1292–1296.
- Stenseth N.C., Ottersen G., Hurrell J.W., Mysterud A., Lima M., Chan K-S. Yoccoz
N.G. & B. Adlandsvik. 2003. Studying climate effects on ecology through the
use of climate indices: the North Atlantic Oscillation, El Niño Southern
Oscillation and beyond. *Proc. R. Soc. Lond. B* ?
- Strimmer K. & O.G. Pybus. 2001. Exploring the demographic history of DNA
sequences using the generalized skyline plot. *Molecular Biology and Evolution*
18: 2298-2305.
- Tafur R., P. Villegas, M. Rabí & C. Yamashiro. 2001. Dynamics of maturation,
seasonality of reproduction and spawning grounds of the jumbo squid *Dosidicus*
gigas (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Peruvian waters. *Fisheries Research*
54: 33-50.
- Taipe A., C. Yamashiro, L. Mariategui, P. Rojas & C. Roque. 2001. Distribution and
concentrations of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) off Peruvian coast between
1991 and 1999. *Fisheries Research* 54: 21-32.
- Thiel M., Macaya E., Acuña E., Arntz W., Bastias H., Brokordt K., Camus P., Castilla

- J.C., Castro L.R., Cortés M., Dumont C.P., Escribano R., Fernández M., Lancelloti D., Gajardo J.A., Gaymer C.F., Gomez I., González A.E., González H.E., Haye P.A., Illanes J.E., Iriarte J.L., Luna-Jorquera G., Luxoro C., Manríquez P.H., Marín V., Muñoz P., Navarrete S.A., Pérez E., Poulin E., Sellanes J., Sepúlveda A., Stotz W., Tala F., Thomas A., Vargas C.A., Vásquez J.A. & A. Vega. 2007. The Humboldt Current System of northern and central Chile. Oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 45: 195-344.
- Triantafillos L, Adams M (2001) Allozyme analysis reveals a complex population structure in the southern calamari *Sepioteuthis australis* from Australia and New Zealand. *Marine Ecology Progress Series* 212:193–209
- Turchin P. & A.D. Taylor. 1992. Complex dynamics in ecological time series. *Ecology* 73: 289-305.
- Vega M.A., Rocha F.J., Guerra A. & Osorio, C. 2002. Morphological differences between the Patagonian squid *Loligo gahi* populations from the Pacific and Atlantic Oceans. *Bulletin of Marine Science* 71 (2): 903-913.
- Villegas P. 2001. Growth, life cycle and fishery biology of *Loligo gahi* (d'Orbigny 1835) off the Peruvian coast. *Fisheries Research* 54: 123-131.
- Yáñez E., Barbieri M.A., Silva C., Nieto K., Espíndola F. 2001. Climate variability and pelagic fisheries in northern Chile. *Progress in Oceanography* 49: 581-596.
- Yáñez E., Barbieri M.A., Silva C. 2003. Fluctuaciones ambientales de baja frecuencia y principales pesquerías pelágicas Chilenas. En: E. Yáñez (ed), *Actividad pesquera*

y de acuicultura en Chile. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, 109-121.

Ward R.D. 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research* 80: 9-18.

Zeidberg LD, BH Robison (2007) Invasive range expansion by the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*, in the eastern North Pacific. *PNAS* 104:12948-12950

Zúñiga M.J., Cubillos L.A. & C.M. Ibáñez. 2008. Synchronous pattern of periodicity in the monthly catch of Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) along the Chilean coast (2002-2005). *Ciencias Marinas* 34: 91-99.

CAPÍTULO II

Artículo enviado a Marine Ecology Progress Series

Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System

C. M. Ibáñez^{1,2}, L. A. Cubillos², R. Tafur³, J. Argüelles³, C. Yamashiro³, E. Poulin¹

1 Laboratorio de Ecología Molecular, Instituto de Ecología y Biodiversidad,
Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las
Palmeras 3425 Ñuñoa, Santiago, Chile.

e-mail: ibanez.christian@gmail.com

2 Laboratorio de Evaluación de Poblaciones Marinas, Departamento de Oceanografía,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción,
Concepción, Chile.

3 Unidad de Investigación en Invertebrados Marinos, Instituto del Mar del Perú, Esquina
Gamarra y General Valle s/n, Chucuito, Callao, Perú.

Abstract During the late Pleistocene-Holocene, the Humboldt Current System (HCS, Peru-Chile) be subject to important oceanographic variations that should have affected abundance and distribution of marine populations as well as their genetic structure and diversity. The fast growth and the short life of *Dosidicus gigas* make squids a valuable

model to evaluate how environmental fluctuations affect the genetic diversity in marine populations. We sequenced a 657 bp fragment of the mtDNA COI gene of 169 jumbo squids from six locations in the HCS. We measured and compared genetic diversity among localities, and performed a neutrality test. We inferred the demographic history of jumbo squids using Bayesian skyline analyses to estimate effective population size through time. A total of 23 haplotypes were found among the sequences. Haplotype and nucleotide diversity were low in all locations. *Dosidicus gigas* was characterized by an absence of population genetic structure and a star-like haplotype network. Neutrality test values were negative and statistically significant, and therefore consistent with a past population expansion. Similarly, Bayesian skyline analyses indicated a recent demographic expansion posterior to the last glacial maximum. Our results suggest that *Dosidicus gigas* consists of a single, large population in the HCS that may have experienced a dramatic demographic population expansion consistent with the oceanographic changes associated with the last glacial-interglacial transition.

Introduction

The Humboldt Current System (HCS) is one of the most productive marine ecosystems on earth. The general oceanography of the HCS is characterized by a predominant northward flow of subantarctic-originated surface waters and by strong upwelling of cool, nutrient-rich water, and a shallow Oxygen Minimum Zone (OMZ), especially in its northern part (Montecino et al. 2005; Thiel et al. 2007; Chavez et al. 2008; Montecino

and Lange 2009). In this ecosystem, the principal marine resources (e.g., fishes, invertebrates and algae) suffer periodical changes associated with different time-scale events such as the El Niño-La Niña cycles (ENSO), the Pacific-Decadal Oscillation (PDO) and beyond at millennial scales (Castilla and Camus 1992; Arcos et al. 2001; Anderson and Rodhouse 2001; Cubillos and Arcos 2002; Chavez et al. 2003; Waluda et al. 2006; Thiel et al. 2007; Chavez et al. 2008). These events, ranging from high to low-frequency variability, produce the same correlated changes between sea-surface temperature variation, wind force intensity, productivity and geographic extension of the OMZ. Such oceanographic changes increase in intensity from short to long time scales, from ENSO, PDO, stadial or interstadial up to glacial and interglacial variations (Stott et al. 2002; Chavez et al. 2008). During the late Pleistocene, glacial episodes were characterized by more intense ocean circulation, while during interglacial episodes the HCS was closer to the coast (Molina-Cruz and Herguera 2002). Similarly, the bathymetric extension of OMZ may contract during cool periods (glacial periods and stadials), and extend during warm ones (Holocene and interstadial) as proposed for the California Current System (CCS) (Cannariato and Kennett 1999). During the last 100,000 years, primary productivity varied with the precessional cycle (~20,000 years) while sea-surface temperature exhibited large amplitude variation related to glacial-interglacial periods (Beaufort et al. 2001; Hebbeln et al. 2002; Felberg and Mix 2003; Kaiser et al. 2005; Montecino and Lange 2009). In these highly variable environments, fluctuations in abundance and distribution of marine populations should impose distinctive genetic signatures in structure and diversity (Rogers & Harpending 1992;

Grant & Bowen 1998; Avise 2000; Lecomte et al. 2004; Hewitt 2004; Cárdenas et al. 2009a).

Cephalopod populations exhibit fluctuations in their abundance mainly because of their accelerated growth, early maturity, high fertility, short life span and high plasticity in their life history strategies (Boyle and Boletzky 1996). Migration patterns, population size and geographic distribution of cephalopods are particularly susceptible to changes in oceanographic conditions (Anderson and Rodhouse 2001; Boyle and Rodhouse 2005; Dawe et al. 2007; Semmens et al. 2007). In the HCS, the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny 1835) exhibits sporadic and short-term pulses in abundance related to environmental changes (e.g., ENSO) (Ichii et al. 2002; Waluda et al. 2006; Keyl et al. 2008). Recently, after the 1997-98 ENSO event, *D. gigas* has experienced a range expansion in both hemispheres linked to an increasing abundance related to expansion of the OMZ (Caddy and Rodhouse 1998; Zeidberg and Robinson 2007; Keyl et al. 2008; Bograd et al. 2008). Moreover, the removal of top predators may have promoted *Dosidicus gigas* population growth by relaxing competition for their shared prey species and may have reduced the mortality by predation of juvenile squids (Zeidberg and Robinson 2007). These fluctuations in population size are directly related to biological characteristics of this squid (Zúñiga et al. 2008). *Dosidicus gigas* has a high dispersal potential due to massive migrations of adults and the passive dispersal of the egg masses and paralarvae (Nigmatullin et al. 2001). The fast growth and short life span strategies of *Dosidicus gigas* together with temporal fluctuations of abundance make this species a valuable model to evaluate how environmental fluctuations affect the genetic

diversity in marine populations. In this context we proposed that: 1) given the characteristics of life history and ecology of *D. gigas* (e.g., pelagic eggs, active migrations), the species should exhibit an absence of population genetic structure in the HCS; 2) marked fluctuations in abundance of *D. gigas* in the Humboldt Current System mean that this species should have a low genetic diversity and low effective population size.

Material and Methods

Sampling

Tissue samples of jumbo squid were collected from two locations of Peru and four locations of Chile between 2005 and 2008 (Table 2.1, Fig. 2.1). Samples from Peru were taken from research cruises of IMARPE and the Chilean samples were obtained from artisanal fisheries dedicated to jumbo squid and as by-catch from industrial mid-trawl fishery of Chilean hake (*Merluccius gayi gayi*).

DNA extraction and amplification

Total DNA was extracted following the saline extraction protocol (Alhjanabi and Martinez 1997). We used the universal primers designed by Folmer et al. (1994) to amplify the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene (COI). PCR amplifications were

carried out using for each sample: 0.3 μ l of *Taq* DNA polymerase (1.5 units) and 2.5 μ l 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0) commercially supplied buffer, with 2 μ l dNTPs (10 μ M), 1.0 μ l 50mM MgCl₂, and 0.5 μ l (10pg/ μ l) of each primer (LCO1490 and HCO2198). After an initial denaturation (3 min at 94° C), the reaction mixtures were subjected to 35 cycles of 94° C (40 s), and 48° C (40 s) and 72° C (60 s) followed by a final extension at 72° C (7 min) using a thermal cycler. PCR products were purified with the Wizard™ Prep system (Promega) following the manufacturer's protocols. Purified PCR products were automatically sequenced (Macrogen Inc, Korea). Sequences were edited and aligned by eye using ProSeq version 2.9 (Filatov 2002).

Population genetic analyses

From the 657 bp COI sequences, standard diversity indices such as the number of haplotypes (H), number of polymorphic sites (S), haplotype diversity (Hd), mean number of pairwise differences (Π), as well as nucleotide diversity (π) were estimated for each location using Arlequin version 3.11 (Excoffier et al. 2005).

The genealogical relationships among haplotypes were assessed with a haplotype network constructed using a median-joining algorithm as implemented in the software Network version 4.501 (Bandelt et al. 1999).

To test for population structure, we calculated pairwise F_{ST} among sampling locations. Significance of pairwise F_{ST} was based on 10,000 permutations as implemented in Arlequin. Additionally, to detect geographical structure among samples,

we performed a Spatial Analysis of MOlecular VAriance (SAMOVA; Dupanloup et al. 2002) using SAMOVA software version 1.01. SAMOVA tests all possible ways to establish groups of populations that maximize the “among-groups” component of the total genetic variance and reduce the “among populations within groups” component. Significance of F_{st} , F_{sc} and F_{ct} fixation index values were computed by a non-parametric permutation procedure with 10,000 iterations.

Demographic analyses

We calculated Tajima's D and Fu's F_s index, and their corresponding P -values in Arlequin software to detect departures from Wright-Fisher mutation-drift equilibrium caused by population expansions or bottlenecks under neutrality hypotheses (Tajima 1996, Fu 1997). To further assess demographic change indicated by the mtDNA data, we constructed the mismatch distribution and estimate the parameters of the demographic expansion by a generalized non-linear least-square approach (Schneider & Excoffier 1999, Excoffier 2004). In this method we estimate the parameters of the demographic expansion τ , θ_0 , and θ_1 . Theta initial $\theta_0 = 2Nu$ (before the population growth or decline), Theta final $\theta_1 = 2Nu$ (after the population growth or decline), and τ (Tau) the date of the growth or decline measured in units of mutational time ($\tau = 2ut$; t is the time in years, and u is the mutation rate per sequence and per year). Confidence intervals for those parameters are obtained by a parametric bootstrap approach (Schneider & Excoffier 1999, Excoffier 2004) implemented in Arlequin.

The demographic history of *Dosidicus gigas* from the Humboldt Current System was also inferred from Bayesian skyline analyses implemented in BEAST version 1.5.4 (Drummond & Rambaut 2007). The Bayesian skyline analysis utilizes Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling of sequence data to estimate a posterior distribution of effective population size (N_e) through time and their Highest Posterior Density intervals (95% HPD) (Drummond et al. 2005). Bayesian skyline analyses were run using the HKY substitution model which was identified as the best fitting model by bayesian decision criteria implemented in jModelTest (Posada 2008) ($-\ln L = 1087.02$, $BIC = 4379.85$). In this set of runs, the mean mutation rate was set with a normal distribution prior ($0.02 \times 10^{-6} \pm 0.005 \times 10^{-6}$ SD) based on values proposed by Perez-Losada et al. (2007) in *Sepia officinalis* and by Strugnell et al. (2008) in octopods. To test the best model of molecular clock evolution (strict or relaxed) of jumbo squid population, we compare with Bayes Factors (Suchard et al. 2001). The relaxed molecular clock with uncorrelated exponential distribution was the model fitted the data decisively better (\log_{10} Bayes Factor = 5.217). The number of grouped intervals (m) was set to 10 and the Bayesian Skyline was performed in the piecewise-constant model. We ran two independent runs of 40,000,000 iterations of the MCMC chains, sampling every 1,000 generations, while the first two million chains were discarded as burn in. Each of the independent log files and tree files was combined using LogCombiner version 1.5.4 (Rambaut & Drummond 2009) obtaining a chain of 72,000,000 steps. The Bayesian skyline plots were generated with the program Tracer version 1.5 (Rambaut & Drummond 2009).

Results

Population genetic analysis

A total of 23 haplotypes were found for the 657 bp fragment in the 169 individuals examined. Haplotype and nucleotide diversity were low in all locations (for pooled samples $H_d = 0.37$, $\pi = 0.00082$) (Table 2.1).

Table 2.1 Sample size, and genetic diversity indexes of *D. gigas* from the Humboldt Current System. For abbreviations see M&M.

Locations	Latitude – Longitude	N	K	S	Hd	π	Π
Huarmey (HU)	10° 00'S, 73° 50' W	27	6	7	0.342	0.00079	0.519
Callao (CA)	12° 05'S, 77° 42'W	33	8	9	0.544	0.00120	0.848
Coquimbo (CQ)	29° 57'S, 71° 22'W	29	8	7	0.430	0.00091	0.613
Valparaiso (VA)	33° 00'S, 71° 43'W	28	4	4	0.206	0.00043	0.286
Santa Maria (SM)	37° 00'S, 73° 35'W	29	6	5	0.320	0.00062	0.409
Isla Mocha (IM)	38° 23'S, 74° 04'W	23	5	5	0.324	0.00066	0.435
Total		169	23	24	0.370	0.00082	0.536

The median-joining network revealed a clear star-like pattern with a dominant central haplotype (H_1) and a very short genealogy (Fig. 2.1). The central haplotype (H_1)

was the most common and the most broadly distributed geographically, while the other haplotypes were separated from H1 by one and two mutations (Fig. 2.1). This network shape was consistent with a population undergoing demographic expansion and lacking genetic population structure (Slatkin and Hudson 1991).

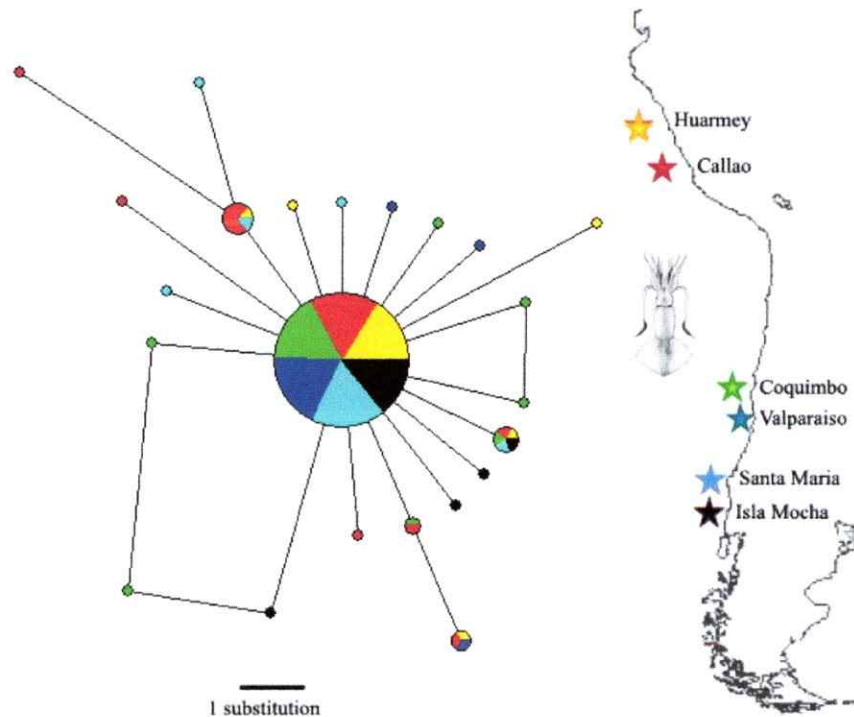


Figure 2.1 Haplotype network of *D. gigas* from the Humboldt Current System

Low and non-significant values of F_{st} suggested that *D. gigas* exists as a large and genetically uniform population across all HCS localities sampled (Table 2.2). The only exception was a significant F_{st} value for the pairwise comparison between populations from Callao and Valparaiso (Table 2.2). This value, however, was not significant at the Bonferroni-corrected level. Moreover, SAMOVA performed for 2 to 5

groups showed low values and non-significant among group variation (2.28 – 4.60 %).

Table 2.2 Fst values (above) and P values (below), of *D. gigas* from the Humboldt Current System

	Huarmey	Callao	Coquimbo	Valparaiso	Santa Maria	Isla Mocha
Huarmey		0.01204	-0.01566	-0.01059	-0.02446	-0.02384
Callao	0.21		0.00933	0.06665	-0.02318	0.0271
Coquimbo	0.86	0.23		0.01179	-0.01248	-0.01654
Valparaiso	0.57	0.02	0.29		-0.00863	-0.00911
Santa Maria	0.99	0.12	0.86	0.70		0.0215
Isla Mocha	0.99	0.14	0.85	0.69	0.99	

Demographic analysis

Values for Tajima's D and Fu's Fs were negative and significant (D = -1.95, P = 0.0076; Fs = -4.23, P = 0.001), and therefore consistent with a past population expansion. The distribution of pairwise differences among sequences was L-shaped, as a consequence of the large majority of individuals sharing the same haplotype (Fig. 2.2). The mismatch distributions did not differ from expected sudden growth-decline model (rg = 0.17, P = 0.64, Fig. 2.2). Based on the expected values in growing and declining populations

(Schneider & Excoffier 1999), sudden expansion time was estimated at 45,261 yrs ago (C.I. 95% 0 – 86,360).

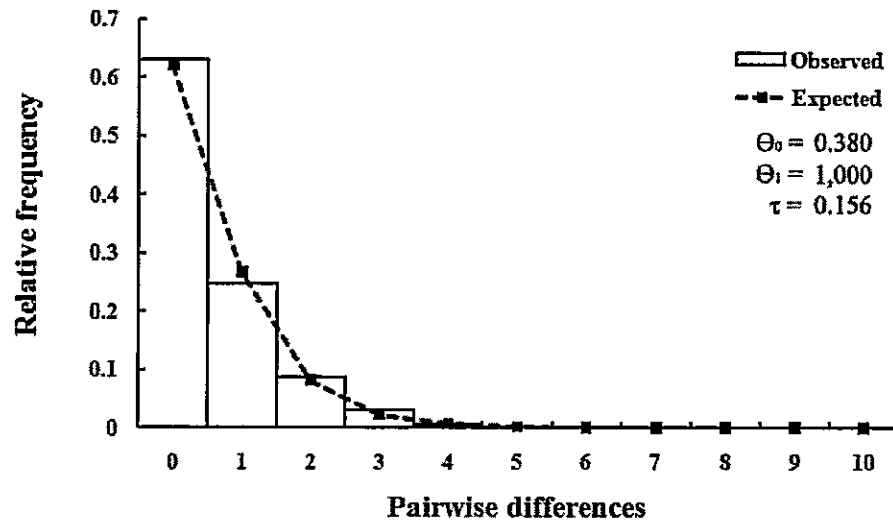


Figure 2.2 Mismatch distribution of *D. gigas* from the Humboldt Current System.

Bayesian skyline analyses indicated that population growth initiated approximately 25,000 years ago in the Humboldt Current system increasing mean population size from around 10,000 individuals to a mean of 5.9 million individuals (HPD 95% 0.44 – 18.8 million) (Fig. 3). The mean time of the most recent common ancestor (tMRCA) was estimated at 40,004 years (HPD 95% 31,932 – 48,176 years).

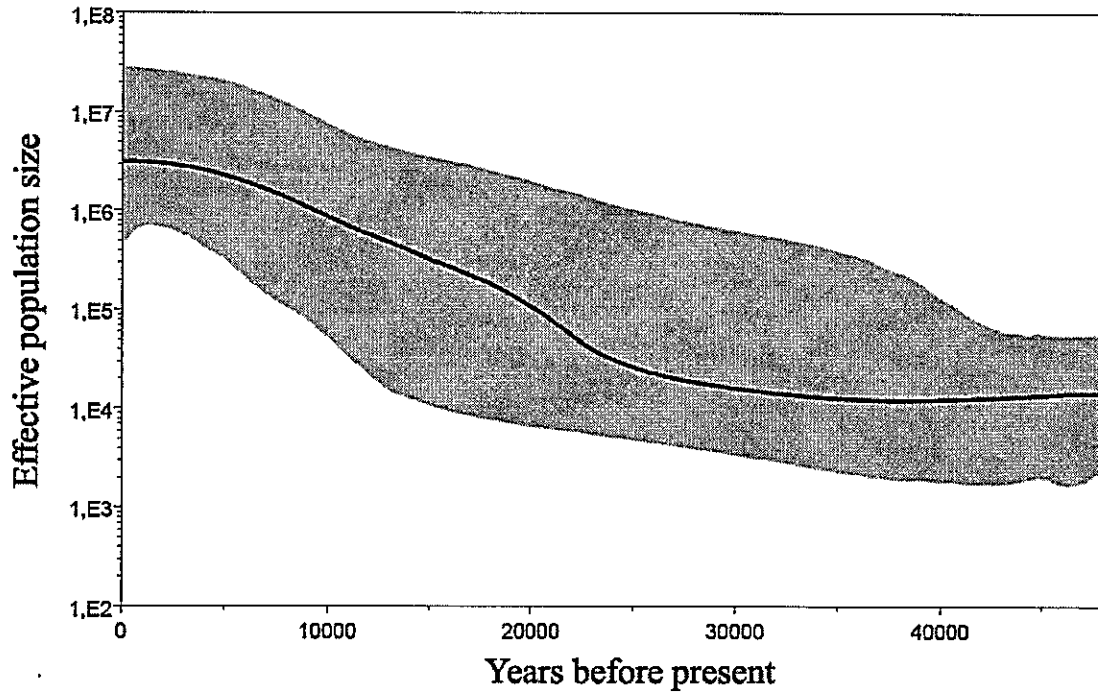


Figure 2.3 Bayesian skyline plot showing changes in effective population size over time in *D. gigas*.

Discussion

Population genetics

Our results suggest that *Dosidicus gigas* consists of a single population with high gene flow along the Humboldt Current System, similar to the results reported for the gastropod *Concholepas concholepas* and the jack mackerel *Trachurus murphyi* (Cárdenas et al. 2009a, 2009b). This absence of genetic structure in the HCS is consistent with the life history of these species, especially with their dispersal or migration capacity. *Concholepas concholepas* develops with a 3-month free living

veliger stage, while *T. murphyi* is considered as a high migratory pelagic fish. In the case of *D. gigas*, extensive seasonal active migrations in HCS, up to 1,000 kilometers, have been related to active feeding, migration and maturation (Nesis 1970, Nigmatullin et al. 2001, Ibáñez & Cubillos 2007, Keyl et al. 2008). These squids can move at a speed of eight to 30 kilometers per day during their migrations, reaching up to 200 km in seven days (Markaida et al. 2005, Gilly et al. 2006b). Furthermore, passive migrations of pelagic egg masses and paralarvae may contribute to high gene flow and long distance dispersal along its distribution range. Fecundity of females can reach 15 to 18 million eggs (Nigmatullin & Markaida 2009) increasing the probability of dispersal along the Pacific Ocean. Recently, Staaf et al. (2008) reported the first discovery of a naturally deposited egg mass of *D. gigas* in the Gulf of California with a volume of 3.13 m³ and an egg density of 0.6 to 2 million. Finally, the great fecundity, the presence of pelagic egg masses and paralarvae and the migration of adults may explain the genetic homogeneity observed for COI gene along the ~3500 km of the Peruvian-Chilean coastline. In a recent study, Sandoval-Castellanos et al. (2010) examined the diversity of Cytb gene along Eastern Pacific, from Baja California to Central Chile. If their main conclusion focused on the absence of phylogeographic structure along the study area, F_{ST} analysis detected the existence of genetic differentiation between Central Chile and almost all other sites from Mexico and Peru. Our results based on COI gene do not support such genetic structure along the HCS. Moreover the same COI haplotype H1 which is dominant in Chilean and Peruvian populations was also found in 43% of 315 squids captured along the north Pacific coast (GenBank access number DQ191367, Gilly

et al. 2006a). The fact that jumbo squids from the northern and southern hemispheres share the same dominant haplotype suggests that equatorial waters do not interrupt gene flow, contrarily to the case of Chilean and Californian jack mackerels (Poulin et al. 2004), and that *D. gigas* maintains genetic cohesiveness all along its distribution range from Alaska to southern Chile as suggest by Sandoval-Castellanos et al. (2010). However, more variable molecular markers may identify finer genetic structure not detected because of the low variability of mitochondrial sequences in this species. Recently, RAPD analysis of samples collected from Mexico, Peru, and Chile suggested the existence of two distinct genetic units separated by the equatorial currents and counter-currents (Sandoval-Castellanos et al. 2007). Nevertheless, even if some genetic structure may occur among distant populations, our results support the existence of a single evolutionary unit for this species.

Demographic history

Theoretically, a very large population size should maintain high levels of genetic variability because genetic drift is low and the rate of accumulation of mutations is high. Despite very large population size, *D. gigas* exhibits low diversity of the mtDNA COI, in agreement with a previous study based on Cytb (Sandoval-Castellanos et al. 2010). Only 23 haplotypes were found in 169 jumbo squids in HCS, with 79 % of them sharing the most common haplotype (H1). In the case of a constant population size and under the Wright-Fisher model hypotheses, the haplotype diversity observed for *D. gigas*

would be generated by an effective population size (N_e) of about 33,000 females, which is considerably smaller than the tens of billions of individuals expected from biomass estimations in the South Pacific Ocean (Nigmatullin et al. 2001). In addition to low haplotype diversity, *D. gigas* shows a star-like network characterized by very short branches as well as a marked L-shaped distribution of pairwise differences. Such a pattern of mtDNA diversity has been traditionally interpreted in two different ways. On the one hand, historical demographic variations may generate such characteristics. For example, a sudden population expansion following a bottleneck event or founder effect will produce a star-like genealogy because all coalescent events occurred at the same time, just before the expansion time (Slatkin & Hudson 1991). However, the existence of a selective sweep (the replacement of mtDNAs through the entire population with a phenotypically advantageous haplotype followed by an accumulation of new neutral variants) would produce a similar pattern of genetic diversity (Maruyama & Birky 1991, Skibinski 2000). Such ambiguity in the interpretation of very short- branched networks and marked L-shaped mismatch will persist if no information is available about nuclear genetic diversity (Bazin et al. 2006). Indeed, a selective sweep occurring in mtDNA should not involve nuclear diversity. In contrast, demographic variation should affect the whole genome, being characterized by low diversity. In the case of *D. gigas*, a recent study using RAPD markers showed a low level of genetic diversity in this species (Sandoval-Castellanos et al. 2007). Because such markers detect variation in short primer sequences in the whole genome, such low diversity should reflect a general tendency for nuclear diversity. These results together with the low diversity of mtDNA

genes support the scenario of a recent demographic expansion over the selective sweep hypothesis. In this context, our results from neutrality tests (Tajima and Fu), and demographic inference analysis suggest that *D. gigas* experienced a dramatic population increase, around 25,000 years ago based on Bayesian approach and only around 45,000 years ago using generalized non-linear least-square approach (Schneider & Excoffier 1999). Based on Cytb gene sequences from Mexico, Peru and Chile and using a similar substitution rate, Sandoval-Castellanos et al. (2010) estimated that population expansion occurred much earlier (between 230,000 to 280,000 years ago). Even using the generalized non-linear least-square approach implemented in Arlequin (Schneider & Excoffier 1999), our date estimate arrived at 45,000 years ago and is still much earlier than the one proposed by Sandoval-Castellanos et al. (2010). Such discrepancy could result from the decision of these authors to pool all their sampling locations to infer a potential time of a global population expansion. Moreover, Minimum Spanning Tree constructed from these sequences did not exhibit the typical star-like shape that characterizes population that passed through a sudden growth phase and therefore did not support the hypothesis of a single expansion at the origin of the actual population *D. gigas* in the whole East Pacific. In contrast, our results at a regional scale clearly showed a robust star-like pattern and highly significant deviation to neutrality tests. Moreover, population growth coincides roughly with the rise in sea-surface temperature and the reorganization of the OMZ in the last 30,000 years (Beaufort et al. 2001, Feldberg & Mix 2003, Kaiser et al. 2005, Montecino & Lange 2009) probably associated with the glacial-interglacial transition and may have been coupled with a latitudinal range

expansion when the environmental conditions became more favorable for this species. The similarity in the genetic diversity pattern in both hemispheres (Gilly et al. 2006a) may reflect a global impact of climatic changes in both HCS and CCS related to glacial and interglacial episodes (Herbert et al. 2001, Montecino & Lange 2009). However, such events should have affect separately both systems, generating regional population growths that could explain the shape of the global network shown by Sandoval-Castellanos et al. (2010). Higher frequency climate variability such as decadal oscillations or ENSO events should also affect population abundance in a similar manner but with lower amplitude. However, because of the strong signal of population expansion detected at a millennium scale in our study, modern fluctuations in abundance on annual or decadal scale would not leave an imprint on the mtDNA diversity.

Acknowledgements We thank A. Díaz, M. Espinoza, C. González and M.C. Pardo-Gandarillas for their help in laboratory analysis and K. Lohrmann for the squid samples from Coquimbo. We thank L. Eaton for their help in language review. This work was funded by CONICYT AT24080021, ICM P05-002, PFB -23, and “Becas de estadías cortas de investigación destinadas a estudiantes tesistas de doctorado y magister de la Universidad de Chile”. C.M. Ibáñez was supported by a CONICYT doctoral fellowship.

LITERATURE CITED

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693
- Anderson CIH, Rodhouse PG (2001) Life cycles, oceanography and variability:

- ommastrephid squid in variable oceanographic environments. *Fish Res* 54:133-143
- Arcos DF, Cubillos LA, Núñez SP (2001) The jack mackerel fishery and El Niño 1997–98 effects off Chile. *Prog Ocean* 49:597–617
- Argüelles J, Yamashiro C (1997) Estimación de la población del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el litoral peruano mediante el análisis de cohortes. *Inf Prog Inst Mar Peru* 72:3-24
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, London
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
- Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312:570-572
- Beaufort L, de Garidel-Thoron T, Mix AC, Pisias NG (2001) ENSO-like Forcing on Oceanic Primary Production During the Late Pleistocene. *Science* 293:2440-2444
- Bograd SJ, Castro CG, Di Lorenzo E, Palacios DM, Bailey H, Gilly W, Chavez FP (2008) Oxygen declines and the shoaling of the hypoxic boundary in the California Current. *Geophys Res Lett* 35:L12607
- Boyle PR, Boletzky SV (1996) Cephalopod populations: definition and dynamics. *Phil Trans R Soc Lon B* 351:985-1002
- Boyle PR, Rodhouse PG (2005) *Cephalopods: ecology and fisheries*. Blackwell Science Ltd, Oxford
- Caddy JF, Rodhouse PG (1998) Cephalopod and groundfish landings: evidence for

- ecological change in global Fisheries?. Rev Fish Biol Fish 8:431-444
- Cannariato K, Kennett J (1999) Climatically related millennial-scale fluctuations in strength of California margin oxygen-minimum zone during the past 60 ky. Geology 27:975-978
- Cárdenas L, Castilla JC, Viard F (2009a) A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. J Biogeogr 36:969-981
- Cárdenas L, Silva AX, Magoulas A, Cabezas J, Poulin E, Ojeda FP (2009b) Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South-eastern Pacific Ocean. Fish Res 100:109-115
- Castilla JC, Camus PA (1992) The Humboldt-El Niño scenario: coastal benthic resources and anthropogenic influences, with particular reference to the 1982/83 ENSO. S Afr J Mar Sci 12:703-712
- Chavez FP, Bertrand A, Guevara-Carrasco R, Soler P, Csirke J (2008) The northern Humboldt Current System: Brief history, present status and a view towards the future. Prog Ocean 79:95-105
- Chavez FP, Ryan J, Lluch-Cota SE, Niñiquen M (2003) From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. Science 299:217-221
- Cubillos LA, Arcos DF (2002) Recruitment of common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off central-south Chile in the 1990s and the impact of the 1997-1998 El Niño. Aquat Living Resour 15:87-94
- Dawe EG, Hendrickson LC, Colbourne EB, Drinkwater KF, Showell MA (2007) Ocean

- climate effects on the relative abundance of shortfinned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealei*) squid in the northwest Atlantic. *Ocean Fish Oceanogr* 16:303–316
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214-222
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22:1185-1192
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11:2571-2581
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol Ecol* 13:853-864
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50
- Fauvelot C, Bernardi G, Planes S (2003) Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. *Evolution* 57:1571–1583
- Feldberg MJ, Mix AC (2003) Planktonic foraminifera, sea surface temperatures, and mechanisms of oceanic change in the Peru and south equatorial currents, 0–150 ka BP. *Paleoceanography* 18:1016-1029
- Filatov DA (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol Ecol Notes* 2:621-624

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome c Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech* 3:294–299
- Fu YX (1995) Statistical properties of segregating sites. *Theor Pop Biol* 48:172-197
- Gilly WF, Elliger CA, Salinas CA, Camarillo-Coop S, Bazzino G, Beman M (2006a) Spawning by jumbo squid *Dosidicus gigas* in San Pedro Mártir Basin, Gulf of California, Mexico. *Mar Ecol Prog Ser* 313:125-133
- Gilly WF, Markaida U, Baxter CH, Block BA, Boustany A, Zeidberg L, Reisenbichler K, Robinson B, Bazzino G, Salinas C (2006b) Vertical and horizontal migrations by the squid *Dosidicus gigas* revealed by electronic tagging. *Mar Ecol Prog Ser* 324:1-17
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineage of marine fishes: insights for sardines and anchovies and lesson for conservation. *J Hered* 89:415-426
- Hebbeln D, Marchant M, Wefer G (2002) Paleoproductivity in the southern Peru-Chile Current through the last 33 000 yr. *Mar Geol* 186:487-504
- Herbert TD, Schuffert JD, Andreasen D, Heusser L, Lyle M, Mix A, Ravelo AC, Stott LD, Herguera JC (2001) Collapse of the California Current during glacial maxima linked to climate change on land. *Science* 293:71-76
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc B* 359:183–195
- Ibáñez CM, Cubillos LA (2007) Seasonal variation in the length structure and

- reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. *Sci Mar* 71:123-128
- Kaiser J, Lamy F, Hebbeln D (2005) A 70-kyr sea surface temperature record off southern Chile (Ocean Drilling Program Site 1233). *Paleoceanography* 20: PA4009
- Keyl F, Argüelles J, Mariátegui L, Tafur R, Wolff M, Yamashiro C (2008) A hypothesis on range expansion and spatio-temporal shifts in size-at-maturity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the eastern Pacific Ocean. *CalCOFI Rep* 49:119-128
- Lecomte F, Grant WS, Dodson JJ, Rodríguez-Sánchez R, Bowen BW (2004) Living with uncertainty: genetics imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Mol Ecol* 13:2169-2182
- Markaida U, Rosenthal JJC, Gilly WF (2005) Tagging studies on the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, Mexico. *Fish Bull* 103:219-226
- Maruyama T, Birky Jr CW (1991) Effects of periodic selection on gene diversity in organelle genomes and other systems without recombination. *Genetics* 127:449-451
- Molina-Cruz A, Herguera JC (2002) Paleooceanographic evolution of backwater in the Nazca region, southeastern Pacific, during late Pleistocene. *Rev Mex Cienc Geol* 19:252-259
- Montecino V, Lange CB (2009) The Humboldt Current System: ecosystem components and processes, fisheries, and sediment studies. *Prog Ocean* 83:65-79
- Montecino V, Strub PT, Chavez FP, Thomas AC, Tarazona J, Baumgartner T (2005)

- Chapter 10 Bio-physical interactions off western South America (6,E). In: Robinson AR, Brink KH (eds) *The Sea*. Cambridge: Harvard University Press
- Nesis KN (1970) The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Okeanology* 10:140-152
- Nigmatullin ChM, Nesis KN, Arkhipkin AI (2001) A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fish Res* 54:9-19
- Nigmatullin ChM, Markaida U (2009) Oocyte development, fecundity and spawning strategy of large sized jumbo squid *Dosidicus gigas* (Oegopsida: Ommastrephinae). *J Mar Biol Ass UK* 89:789–801
- Pérez-Losada M, Nolte MJ, Crandall KA, Shaw PW (2007) Testing hypotheses of population structuring in the Northeast Atlantic Ocean and Mediterranean Sea using the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mol Ecol* 16:2667–2679
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253-1256
- Poulin E, Cárdenas L, Hernández CE, Ojeda FP, Kornfield I (2004) Resolution of the taxonomic status of Chilean and Californian jack mackerels using mitochondrial DNA sequence. *J Fish Biol* 65:1160-1164
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) LogCombiner v1.5.3, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/LogCombiner>
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v1.5, Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>
- Sandoval-Castellanos E, Uribe-Alcocer M, Díaz-Jaimes P (2007) Population genetic

- structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fish Res* 83:113–118
- Sandoval-Castellanos E, Uribe-Alcocer M, Díaz-Jaimes P (2010) Population genetic structure of the Humboldt squid (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835) inferred by mitochondrial DNA analysis. *J Exp Mar Biol Ecol* 385:73–78
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079-1089
- Semmens JM, Pecl GT, Gillanders BM, Waluda CM, Shea EK, Jouffre D, Ichii T, Zumholz K, Katugin ON, Leporati SC, Shaw PW (2007) Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Rev Fish Biol Fish* 17:401–423
- Skibinski DOF (2000) DNA tests of neutral theory: applications in marine genetics. *Hydrobiologia* 420:137-152
- Slatkin M (1977) Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinction. *Pop Biol* 12:253-262
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129:555–562
- Staaf DJ, Camarillo-Coop S, Haddock HD, Nyack AC, Payne J, Salinas-Zavala CA, Seibel BA, Trueblood LI, Widmer Ch, Gilly WF (2008) Natural egg mass deposition by the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California and characteristics of hatchlings and paralarvae. *J Mar Biol Ass UK* 88:759-770
- Stenseth NC, Mysterud A, Ottersen G, Hurrell JW, Chan K-S, Lima M (2002)

- Ecological effects of climate fluctuations. *Science* 297:1292–1296
- Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18:1001-1013
- Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595
- Thiel M, Macaya E, Acuña E, Arntz W, Bastias H, Brokordt K, Camus P, Castilla JC, Castro LR, Cortés M, Dumont CP, Escribano R, Fernández M, Lancelloti D, Gajardo JA, Gaymer CF, Gomez I, González AE, González HE, Haye PA, Illanes JE, Iriarte JL, Luna-Jorquera G, Luxoro C, Manríquez PH, Marín V, Muñoz P, Navarrete SA, Pérez E, Poulin E, Sellanes J, Sepúlveda A, Stotz W, Tala F, Thomas A, Vargas CA, Vásquez JA, Vega A (2007) The Humboldt Current System of northern and central Chile. Oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Ocean Mar Biol: An Ann Rev* 45:195-344
- Waluda CM, Yamashiro C, Rodhouse PG (2006) Influence of the ENSO cycle on the light-fishery for *Dosidicus gigas* in the Peru Current: An analysis of remotely sensed data. *Fish Res* 79:56–63
- Zeidberg LD, Robison BH (2007) Invasive range expansion by the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*, in the eastern North Pacific. *Proc Nat Acad Sci* 104:12948-12950
- Zúñiga MJ, Cubillos LA, Ibáñez CM (2008) Synchronous pattern of periodicity in the monthly catch of Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) along the Chilean coast (2002-2005). *Cienc Mar* 34:91–99

CAPÍTULO III

Artículo enviado a Journal of Molluscan Studies

Spatial genetic structure and demographic inference of *Doryteuthis (Amerigo) gahi* (d'Orbigny 1835) in the Southeastern Pacific Ocean

Christian M. Ibáñez¹, Juan Argüelles², Carmen Yamashiro², Luis Adasme³, Renato
Céspedes³, Elie Poulin¹

1 Laboratorio de Ecología Molecular, Instituto de Ecología y Biodiversidad, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425 Ñuñoa, Santiago, Chile.

e-mail: ibanez.christian@gmail.com

2 Unidad de Invertebrados Marinos, Instituto del Mar del Perú, Esquina Gamarra y General Valle s/n, Chucuito, Callao, Perú.

3 Instituto de Fomento Pesquero, Blanco 839, Valparaíso, Chile.

Abstract

Doryteuthis gahi is a small size squid species that has a wide distribution in South America. This species is characterized by coastal and benthic spawning, and its ontogenetic vertical migration is associated with upwelling zones, features that may restrict dispersal potential. It has also been proposed that populations of these neritic

squids are structured by the influence of local processes which act as barriers to gene flow. Based on this background, we evaluate the geographical structure of genetic diversity in *D. gahi* along its distribution in the southeastern Pacific Ocean. We considered 116 COI mtDNA sequences of squids collected from different sites in Peru and Chile and calculated genetic diversity, population structure index F_{st} , analysis of spatial molecular variance and exact tests to detect differences among localities. To infer demographic history we carried out tests of neutrality, mismatch distribution and Bayesian skyline analysis. Despite not observed molecular divergence between Peru and Chile, we detected a significant genetic differentiation of *D. gahi* along its geographical distribution. Squids from Chile showed higher genetic diversity than those of Peru and the results of the demographic inference analysis suggest that the population of Peru is experiencing or experienced in the recent past demographic expansion, a pattern that was not evidenced in Chile.

Key words: Genetic diversity, squids, migrations, populations.

Introduction

The Humboldt Current System (HCS) produces more fish per unit area than any other region on earth, because is one of the most productive upwelling ecosystems (Thiel et al. 2007, Chavez et al. 2008). In addition to the high productivity of small pelagic fish, the HCS is notable for its large scale connectivity associated with ENSO, decadal and centennial variability, and a large and dynamic oxygen minimum zone (OMZ) (Montecino and Lange 2009). Currently, the most important process that influences the

northern HCS is the El Niño Southern Oscillation (ENSO), which impacts climate, ecosystems and fisheries (Chavez et al. 2008). The ENSO has been a critical dynamic factor in the HCS for at least 130,000 yr, showing its maximum activity in the last 12,000 yr (Moy et al. 2002, Cane 2005). The ENSO impacts may induce changes in population survival and/or recruitment, producing variations in the local abundance, geographical distribution and gene flow structure of populations (Camus 2008). Some studies revealed a genetic bottleneck after ENSO events in seaweeds and fur seals of the northern HCS (Martínez et al. 2003, Oliveira et al. 2009). If a single event can produce such result, the question arises as to what the cumulative effect may be at a longer time scale. Thiel et al. (2007) predicted that taxa with high connectivity and large geographical ranges should be less affected by ENSO than other species which have low connectivity and /or narrow distribution range. However, empirical data are needed to verify these predictions.

In HCS the loliginid squid *Doryteuthis gahi* (d'Orbigny 1835) lives on the continental shelf where its complete life cycle takes place. Based on landings in Peruvian waters, Villegas (2001) demonstrated a relationship between El Niño and La Niña events and *D. gahi* catches, which suggests that warmer periods may affect negatively the population size of this species. However, Semmens et al. (2007) mentioned that ENSO events could potentially cause a shift in distribution rather than a decline in overall population size. The life cycle of *D. gahi* may permit such a distribution shift, to deeper waters; it is known that vertical migrations of adults are associated with changes in the water temperature. Adults are found at greater depths

(400 – 600 m) in winter and migrate toward shallow waters in summer where they mate and lay egg masses on the seabed (8 – 70 m depth) (Arkhipkin et al. 2000, Villegas 2001, Laptikhovsky 2008). Moreover, juveniles move to deeper waters of the shelf where they feed and grow; the adults then return to the coast to spawn and die (Hatfield et al. 1990, Arkhipkin et al. 2004).

Previous genetic studies of *D. gahi* in the southwest Atlantic found an absence of population genetic structure that suggests the existence of important gene flow in this species (Isozymes: Carvalho & Lonely 1989, Carvalho & Pitcher 1989, Simple Sequence Repeats: Shaw et al. 2004): Apparently, the oceanographic conditions of the southwest Atlantic favor the dispersal of the paralarvae and adults and result in homogenization of the population (Vega et al. 2002, Shaw et al. 2004). at a larger geographic scale, significant differentiation was found between samples from the Falkland Islands and from Peru using microsatellite markers (Shaw et al. 2004). These results suggest the existence of genetic support of the morphological differences reported among squids from Peru, Chile, and Falkland (Vega et al. 2002). In the HCS, no genetic studies have been performed despite some evidence of the existence of two population units. Landing statistics in the HCS area indicate the presence of two principal landing zones of *D. gahi*, one in south-central Chile (34° S to 42°S) and the other in Peru (3°S to 12°S). The absence of landings between 20°S to 34°S suggests low abundance of this species in northern Chile; it is likely that in the Pacific Ocean, *D. gahi* does not have a continuous geographic distribution. Morphological studies demonstrated the existence of differences between the regions of major abundance (Peru

and Chile), explained by environmental differences in water masses and with possible genetic origin (Vega et al. 2002).

The objective of this study was to examine the existence of two population units of *D. gahi* in HCS by means of mtDNA. To do so, we performed several statistical analyses and a historical inference of lineages. We hypothesize that the life history characteristics of *D. gahi* could favor the contemporary spatial structuring of populations and that historical process of the HCS have affected the demographic history of this squid. In this context we propose the existence of two populations of *D. gahi* in HCS with geographical variations in genetic diversity and effective population size.

Material and Methods

Sampling

Tissue samples of 116 squids were collected from two locations of Peru and two locations of Chile during 2007 and 2008 (Table 1). Samples from Peru were taken from artisanal fisheries dedicated to loliginid squids and the Chilean samples were obtained from research cruises of IFOP (Instituto de Fomento Pesquero) and from the by-catch of artisanal fishery of small pelagic fishes.

DNA extraction and amplification

Total DNA was extracted following the saline extraction protocol (Alhjanabi and Martinez 1997). We used the universal primers designed by Folmer et al. (1994) to amplify the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene (COI). PCR amplifications were carried out using for each sample: 0.3 μ l of *Taq* DNA polymerase (1.5 units) and 2.5 μ l 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0) of commercially supplied buffer, with 2 μ l dNTPs (10 μ M), 1.0 μ l 50mM MgCl₂, and 0.5 μ l (10pg/ μ l) of each primer (LCO1490 and HCO2198). After an initial denaturation (3 min at 94° C), the reaction mixtures were subjected to 35 cycles of 94° C (40 s), and 48° C (40 s) and 72° C (60 s) followed by a final extension at 72° C (7 min) using a thermal cycler. PCR products were purified with the Wizard™ Prep system (Promega) following the manufacturer's protocols. Purified PCR products were automatically sequenced (Macrogen Inc, Korea); 683-bp COI sequences were edited and aligned by eye using ProSeq version 2.9 (Filatov 2002).

Population genetic analyses

Standard diversity indices such as the number of haplotypes (K), number of polymorphic sites (S), haplotype diversity (Hd), mean number of pairwise differences (Π), as well as nucleotide diversity (π) were estimated for each location using Arlequin version 3.11 (Excoffier et al. 2005). The genealogical relationships among haplotypes were assessed with a haplotype network constructed using a median-joining algorithm as implemented in the software Network version 4.501 (Bandelt et al. 1999).

To test for population structure we calculated pairwise F_{ST} among sampling locations.

Significance of pairwise F_{ST} was based on 10,000 permutations as implemented in Arlequin software version 3.11 (Excoffier et al. 2005). Additionally, we performed exact tests in Arlequin to detect differences among haplotype frequencies between samples. This test is an extension of Fisher's exact probability test for contingency tables (Slatkin 1994). Instead of enumerating all possible contingency tables, a Markov chain is used to explore efficiently the space of all possible tables, with a length of 50,000 steps. Additionally, to detect major genetic breaks among samples, we performed a Spatial Analysis of MOlecular VARIance (SAMOVA; Dupanloup et al. 2002) using SAMOVA software version 1.01. SAMOVA tests all possible ways to establish groups of populations that maximize the "among-groups" component of the total genetic variance and reduce the "among populations within groups" component. Significance of F_{ST} , F_{SC} and F_{CT} fixation index values were estimated by a non-parametric permutation procedure with 10,000 iterations.

Demographic analyses

We calculated Tajima's D and Fu's F_s index as well as their corresponding P-values in Arlequin software to detect departures from Wright-Fisher mutation-drift equilibrium caused by population expansions or bottlenecks under neutrality hypotheses (Tajima 1996; Fu 1997).

The demographic history of *Doryteuthis gahi* from the HCS was also inferred from Bayesian skyline analyses implemented in BEAST version 1.5.3 (Drummond and

Rambaut 2007). The Bayesian skyline utilizes Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling of sequence data to estimate a posterior distribution of effective population size (N_e) through time and their Highest Posterior Density intervals (95% HPD) (Drummond et al. 2005). Bayesian skyline analyses were run using the HKY substitution model which was identified as the best fitting model by Bayesian decision criteria implemented in jModelTest (Posada 2008) ($-\ln L = 1087.02$, $BIC = 4379.85$). To test the best model of molecular clock evolution (strict or relaxed) of *D. gahi* populations, we compared with Bayes Factors (Suchard et al. 2001). The relaxed molecular clock with uncorrelated exponential distribution was decisively the model which best fitted the data (\log_{10} Bayes Factor = 0.71). In this set of runs, the mean mutation rate was set with a normal distribution prior ($0.02 \times 10^{-6} \pm 0.01 \times 10^{-6}$ SD). The number of grouped intervals (m) was set to 10 and the Bayesian Skyline was performed in the stepwise-constant model. We ran two chains of 20,000,000 iterations of the MCMC, sampling every 1,000 generations; the first two million chains were discarded as burn-in. Each of the independent log files and tree files was combined using LogCombiner version 1.5.3 (Rambaut and Drummond 2009) obtaining a chain of 36,000,000 steps. The Bayesian skyline plots were generated with the program Tracer version 1.5 (Rambaut and Drummond 2009).

Results

Population genetic analysis

A total of 15 haplotypes were found among the examined 116 individuals from four localities. Haplotype diversity (H_d) ranged from 0.343 in Chimbote to 0.809 in Talcahuano (Table 3.1), and nucleotide diversity (π) varied from 0.00054 in Chimbote to 0.00244 in Talcahuano (Table 3.1). The pooled regional genetic variability for Peruvian localities was very low ($H_d = 0.423$, $\pi = 0.00079$) compared to Chilean locations ($H_d = 0.779$, $\pi = 0.00227$).

Table 3.1 Sample size, and genetic diversity indexes of *D. gahi* from the Humboldt Current System. For abbreviations see M&M

Location	Latitude, Longitude	n	S	K	H_d	π	Π
Paíta	5° 03'S, 81° 06'W	26	6	5	0.508	0.00106	0.726
Chimbote	9° 08'S, 78° 35'W	32	5	6	0.343	0.00054	0.371
Talcahuano	36° 42'S, 73° 02'W	27	6	5	0.809	0.00244	1.664
Chiloé	42° 50'S, 72° 55'W	31	4	5	0.755	0.00211	1.441
Total		116	14	15	0.730	0.00180	1.226

The median-joining network revealed a pattern with a dominant central haplotype (H_1) and a short genealogy (Fig. 3.1). Haplotype H_1 was the most common and the most broadly distributed geographically, and the only one shared between all locations. In contrast to Peruvian locations where H_1 was the single dominant haplotype, Chilean

samples presented three other frequent haplotypes (H11, H12, H13) separated by one or two substitutions from the central haplotype. Other haplotypes are rare or unique in Peruvian and Chilean locations (Fig. 3.1).

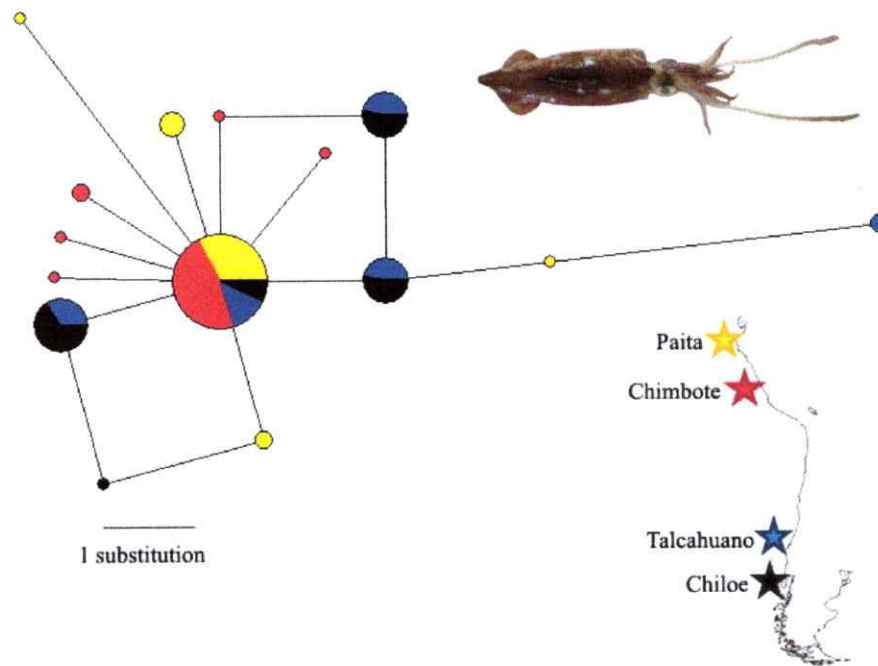


Figure 3.1. Haplotype network of *D. gahi* in HCS.

The exact test showed highly significant differences ($P < 0.001$) in haplotype frequency among locations, and the highly significant values of F_{ST} suggest that *D. gahi* is composed of two populations across the HCS localities sampled (Table 3.2). However, SAMOVA analysis did not detect significant geographic structure, probably due to the small number of sample locations. The genetic variance explained by the among groups component was maximized (25.12 %) when samples were pooled as Chilean and Peruvian groups. Among populations within groups was low (0.76%) and

most of genetic variance were explained by “within population” component (74.12%) This result is a consequence of the short genealogy including a shared haplotype (H1) between Chilean and Peruvian locations and the absence of clear phylogeographic structure. Based on these results, we will consider Chilean and Peruvian populations for further analysis.

Table 3.2 Fst values (above) and P values (below), of *D. gahi* from the Humboldt Current System

	Paíta	Chimbote	Talcahuano	Chiloé
Paíta		0.10118+0.0029	0.00000+0.0000	0.00000+0.0000
Chimbote	0.03002		0.00000+0.0000	0.00000+0.0000
Talcahuano	0.19665	0.27886		0.42372+0.0051
Chiloé	0.30248	0.38855	-0.00216	

Demographic analysis

Both Tajima’s D ($D = -2.19$, $P < 0.01$) and Fu’s F_s ($F_s = -8.22$, $P < 0.01$) were negative and significant in the Peruvian population, but not in the Chilean population ($D = 0.06$, $P > 0.05$; $F_s = 0.46$, $P > 0.05$).

Bayesian skyline analyses of the Peruvian population indicated that population

growth initiated approximately 30,000 years ago in the northern HCS system, increasing mean population size from around 1,000 individuals to a mean of 0.8 million individuals (HPD 95% 0.06 – 4.7 million) (Fig. 2a). The mean time of the most recent common ancestor (MRCA) was estimated at 39,057 years (HPD 95% 31,256 – 46,876 years). The Chilean population showed a constant population size through time in the southern HCS; it maintained mean population size of 50,000 individuals (HPD 95% 69,350 – 724,020 individuals) (Fig. 2b). The mean time of MRCA was estimated at 98,992 years (HPD 95% 79,872 – 118,840 years).

a)

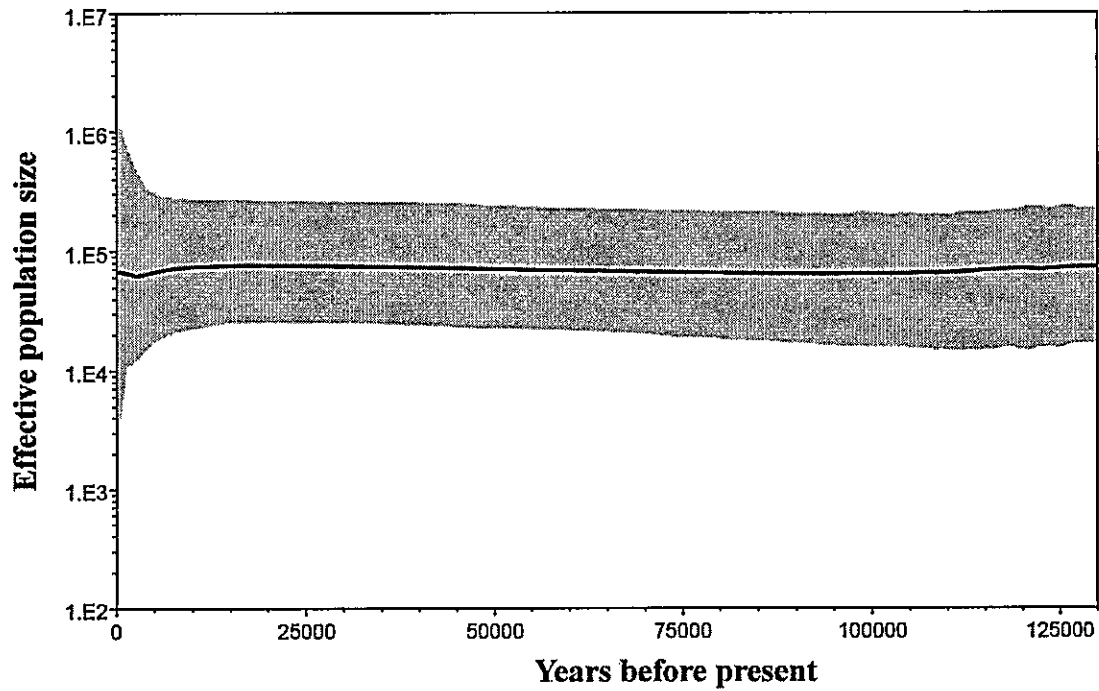
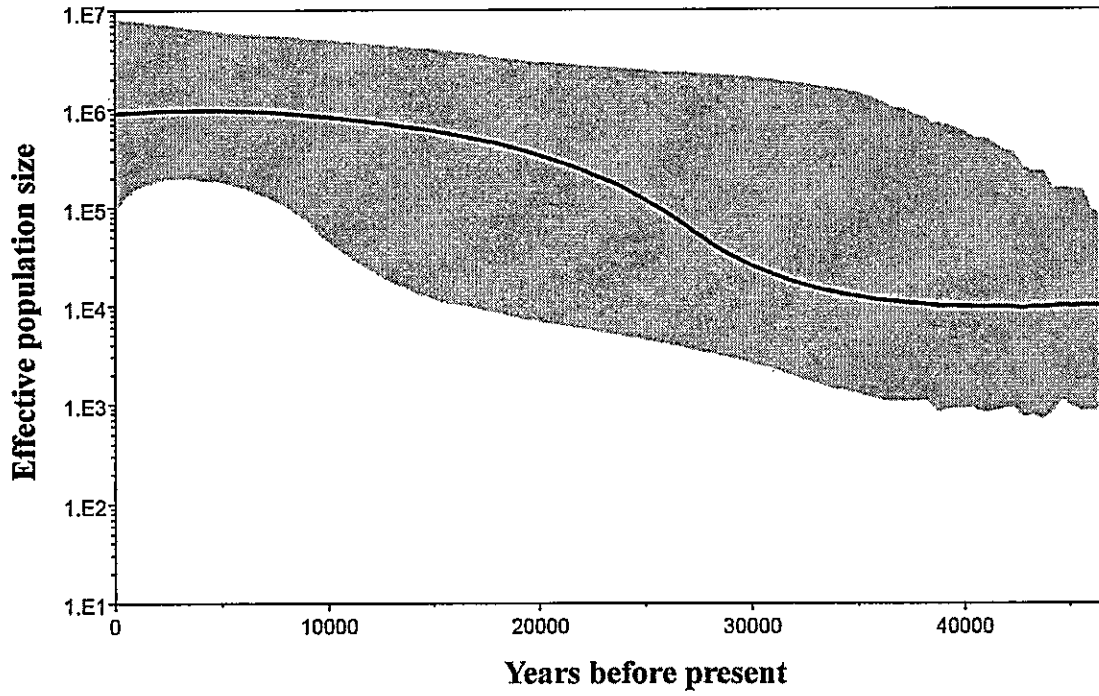


Figure 3.2. Bayesian skyline plot of Peruvian (a) and Chilean (b) populations of *D. gahi* in HCS.

Discussion

Population genetics

In this study we found that *Doryteuthis gahi* exhibits genetic structure along the Humboldt Current System, even if differentiation was moderate between Chilean and Peruvian populations. This genetic structure in the HCS is consistent with the life history of this species, especially with their benthic spawning, indicating that this species has genetically heterogeneous populations. Passive migrations of paralarvae and benthic egg masses may contribute to moderate gene flow and a low potential dispersal along its distribution range. Recently, microsatellite genetic analysis of samples collected from Falkland Island and Peru (Shaw et al. 2004) and morphological analyses from Peru, Chile and Falkland Island (Vega et al. 2002) suggested the existence of almost two populations generated by environmental and geographical barriers. Unfortunately we only obtained three squid from northern Chile (Iquique 20°S, 70°W) because this species had low abundance during the study period; thus we could not analyze the mechanism of differentiation (e.g., isolation by distance). The three sequences we obtained correspond to the most frequent and shared haplotype (H1) (not shown), indicating that it is likely that the squids from northern Chile and Peru form a single genetic unit. Vega et al. (2002) mentioned that migrations of juveniles and adults between Peru, Chile and Falkland Island are unlikely, due to different water masses in each location. This idea suggests that some local adaptation occurs, such as in Peru and

northern Chile where these squid spawn on sandy bottoms and recruitment occurs throughout the year (Villegas 2001), while in southern Chile and Falkland Island they spawn in seaweeds and/or soft corals and recruitment occurs principally in spring and autumn (Hatfield 1996, Arkhipkin et al. 2000, Laptikhovsky 2008). These latitudinal differences in life history traits are similar to other loliginid squids in northeastern Pacific and northwestern Atlantic oceans (see Reichow and Smith 2001, Buresch et al. 2006).

The horizontal migration of adults of loliginid squids does not seem to be very common and the paralarvae and juveniles may have a limited dispersal (Boyle 1983). Studies in Iberian Peninsula waters have shown that the upwelling areas represent favorable habitats for the cephalopod paralarvae and changes in the intensity of upwelling may have an impact on the recruitment, abundance and retention of these early stages (Rocha et al. 1999, Gonzalez et al. 2005, Moreno et al. 2009). The great swimming ability of loliginid paralarvae (Bartol et al. 2008) can make the retention process stronger in bays and other protected areas, diminishing the effects of offshore advection in the surface Ekman layer and consequently decreasing the gene flow among the upwelling areas in HCS.

Many molecular phylogeographic studies have separated groups in relation to biogeographic provinces as identified from traditional faunal lists (Avice 2000). Along the Chilean coast, many studies have recognized three biogeographical provinces with breaks around 30°S and 42°S (Brastom and Johanssen 1983, Lanceloti and Vásquez 1999, Camus 2001, Ibáñez et al. 2009). These provinces exhibit different biotas and the

breaks are explained by contemporary and historical processes (Camus 2001). In the case of cephalopods the existence of marked biogeographical breaks at 30° and 42° S affecting their distribution suggests that external forcing and physical factors rather than temperature gradients restrict their dispersion and migration (Ibáñez et al. 2009). In addition, Chilean waters are characterized by the presence of several upwelling zones that are not connected (Thiel et al. 2007) and could represent a discontinuous habitat for this neritic squid species. In fact, it has been proposed for loliginid squids that the patterns of connectivity among populations could be limited by the outfall of large rivers or abrupt changes of the depth of the continental shelf, which operate as barriers to gene flow (Brierley et al. 1995; Shaw et al. 1999, Herke & Foltz 2002, Semmens et al. 2007, Aoki et al. 2008).

Demographic history

We found strong geographical differences in the demographic history of *D. gahi* in HCS. Based on the time of MRCA we propose that the Peruvian population is a result of a founder event from the Chilean population. The expansion of this population occurred from 40,000 to 25,000 yr ago, leading to a constant effective population size of around 1 million of individuals up to the present. Conversely, the Chilean population has always been constant in size (100,000 individuals) for the last 120,000 years. Paleoceanographic reconstructions of productivity show latitudinal differences in the HCS. In Peru in the last glacial period high values were found with a significant reduction in the last

interglacial and Holocene periods, in contrast to an increase in productivity in central and southern Chile in these periods (Montecino and Lange 2009). This pattern is related to geographic variations in effective population size of *D. gahi*, suggesting different population responses to climate change during the last 100,000 yrs.

From the ecological point of view, *Doryteuthis gahi* populations are modified to spawning and embryonic development in cold waters (Arkhipkin et al. 2000, Cinti et al. 2004); which explains why the geographical distribution of this species in the Pacific and Atlantic oceans can reach to limit of the cold currents (Campos et al. 1995, Thiel et al. 2007). These antecedents support the scenario of southern South America as the more ancestral area of distribution and the Peruvian population as a recent invasion by a founder event in the Pleistocene.

Effective population size and genetic diversity were very different among Peruvian and Chilean populations. In the case of squids from Peru, low diversity and high N_e are consistent with population expansion, while the high diversity and low N_e in squids from Chile are more difficult to explain. For various populations of coastal fishes with high genetic diversity, the extinction and recolonization process is known to be related to climate changes in the Pleistocene (Dawson et al. 2001, Lecomte et al. 2004, Larmuseau et al. 2009). Another explanation suggested that fish populations with high diversity may be attributed to large stable population with long evolutionary history or secondary contact between lineages (Grant and Bowen 1998). The Chilean population of *D. gahi* is compatible with both ideas; we think that the current genetic patterns are consequences of northward migrations in the glacial periods and posterior re-colonization of the

southern Chile in the interglacial. In this hypothesis the squids could maintain a metapopulation-like structure in the Pacific Ocean with different rates of extinction, migration and colonization between locations.

Acknowledgements We thank A. Díaz, M. Espinoza, C. González and M.C. Pardo-Gandarillas for their help in laboratory analysis. We thank to F. Keyl and L. Eaton for their help in language review and some comments. This work was funded by CONICYT AT24080021, ICM P05-002, PFB -23, and “Becas de estancias cortas de investigación destinadas a estudiantes tesistas de doctorado y magister de la Universidad de Chile”. C.M. Ibáñez was supported by a CONICYT doctoral fellowship.

References

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25(22):4692-3
- Aoki M., H. Imai, T. Naruse, Y. Ikeda. 2008. Low genetic diversity of oval squid, *Sepioteuthis cf. lessoniana* (Cephalopoda: Loliginidae), in Japanese waters inferred from a mitochondrial DNA non-coding region. *Pacific Science* 62: 403-411.
- Arkhipkin A.I., V.V. Laptikhovsky & D.A.J. Middleton. 2000. Adaptations for cold water spawning in loliginid squid: *Loligo gahi* in Falkland waters. *Journal of Molluscan Studies* 66:551–564.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography*. Harvard University Press, Massachusetts, 446 pp.

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
- Bartol I.K., P.S. Krueger, J.T. Thompson, W.J. Stewart. 2008. Swimming dynamics and propulsive efficiency of squids throughout ontogeny. *Integrative and Comparative Biology* 1-14.
- Boyle P.R. 1983. Cephalopod life cycles, vol I. Species accounts. Academic Press, London.
- Boyle PR, Rodhouse PG (2005) Cephalopods: ecology and fisheries. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company Editorial offices: Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ
- Buresch K.C., G. Gerlach , R.T. Hanlon. 2006. Multiple stocks of longfin squid *Loligo pealeii* in the NW Atlantic: stocks segregate inshore in summer, but aggregate offshore in winter. *Marine Ecology Progress Series* 310: 263-270.
- Campos E.J.D., Miller J.L., Müller T.J., Peterson R.G. 1995. Physical oceanography of the Southwest Atlantic Ocean. *Oceanography* 8: 87-91.
- Camus P.A. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 587-617.
- Camus P:A. 2008. Understanding biological impacts of ENSO on the eastern Pacific: an evolving scenario. *Int. J. Environment and Health* 2: 5-19.
- Cane M.A. 2005. The evolution of El Niño, past and future. *Earth and Planetary Science Letters* 230: 227-240.
- Grant W.S., Bowen B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary

- lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415-426.
- Grosberg R.K. & C.W. Cunningham. 2001. Genetic structure in the sea: from populations to communities. In: M.D. Bertness, S. Gaines, & M.E. Hay (eds.) *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp 61-84.
- Dawson M.N., R.S. Waples & G. Bernardi. 2006. Phylogeography. In: L.G.D. Allen, D.J. Pondella & M.H. Horn (eds.). *The Ecology of Marine Fishes: California and Adjacent Waters*. University of California Press. pp 26-54.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22:1185-1192
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11:2571-2581
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50
- Filatov DA (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets" *Mol Ecol Notes* 2:621-624
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech* 3:294-299
- Fu YX (1995) Statistical properties of segregating sites. *Theor Pop Biol* 48:172-197
- González, F., Otero, J., Guerra, A. Rocha FJ, Dale AW (2005) Distribution of common

- octopus and common squid paralarvae in a wind-driven upwelling area (Ria of Vigo, northwestern Spain). *J. Plankton Res.*, 27, 271–277.
- Herke S.W. & D.W. Foltz. 2002. Phylogeography of two squid (*Loligo pealei* and *L. plei*) in the Gulf of Mexico and northwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology* 140:103–115.
- Ibáñez C.M., Camus P.A. & F. Rocha (2009) Diversity and distribution of cephalopod species of the coast off Chile. *Marine Biology Research* 5(4): 374-384.
- Larmuseau M.H.D., Van Houdt J.K.J., Guelinckx J., Hellemans B., Volckaert F.A.M. 2009. Distributional and demographic consequences of Plesitocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. *Journal of Biogeography* 36: 1138-1151.
- Laptikhovsky V. 2008. New data on spawning and bathymetric distribution of the Patagonian squid, *Loligo gahi*. *Marine Biodiversity Records* 1: e50.
- 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: 2169-2182.
- Martínez E.A., Cárdenas L., Pinto R. 2003. Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* 20 years after El Niño 1982–1983. *Journal of Phycology* 39: 504–508.
- Montecino V, Lange CB (2009) The Humboldt Current System: ecosystem components and processes, fisheries, and sediment studies. *Prog Ocean* 83:65-79

- Moreno A., Dos Santos A., Piatkowski U., Santos A.M.P., Cabral H. 2009. Distribution of cephalopod paralarvae in relation to the regional oceanography of the western Iberia. *Journal of Plankton Research* 31: 73–91.
- Moy C.M., Seltzer G.O., Rodbell D.T., Anderson D.M. 2002. Variability of El Niño/Southern Oscillation activity at millennial timescales during the Holocene epoch. *Nature* 420: 162–165.
- Palumbi S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13: 146-158.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evolution* 25:1253-1256.
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) LogCombiner v1.5.3, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/LogCombiner>
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v1.5, Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>
- Reichow D. Smith R.J. 2001. Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens* *Molecular Ecology* 10: 1101–1109.
- Rocha, F., Guerra, A., Prego, R., U. Piatkowski (1999) Cephalopod paralarvae and upwelling conditions off Galician waters (NW Spain). *J. Plank. Res.*, 21, 21–33.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569
- Semmens J.M., G.T. Pecl, B.M. Gillanders, C.M. Waluda, E.K. Shea, D. Jouffre, T.

- Ichii, K. Zumholz, O.N. Katugin, S.C. Leporati & P.W. Shaw. 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Review in Fish Biology and Fisheries* 17:401–423.
- Shaw P.W., G. Pierce & P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the Veined squid *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae) uncovered using microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8:407–417.
- Shaw P.W., G.J. Adcock, W.J. Burnett, G.R. Carvalho & A.I. Arkhipkin. 2004. Temporally distinct spawning cohorts and geographically distinct spawning aggregations within the Patagonian squid *Loligo gahi* do not represent genetically differentiated sub-populations. *Marine Biology* 144:961–970.
- Tajima F. (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Thiel M., E. Macaya, E. Acuña, W. Arntz, H. Bastias, K. Brokordt, P. Camus, J.C. Castilla, L.R. Castro, M. Cortés, C.P. Dumont, R. Escribano, M. Fernández, D. Lancelloti, J.A. Gajardo, C.F. Gaymer, I. Gomez, A.E. González, H.E. González, P.A. Haye, J.E. Illanes, J.L. Iriarte, G. Luna-Jorquera, C. Luxoro, P.H. Manríquez, V. Marín, P. Muñoz, S.A. Navarrete, E. Pérez, E. Poulin, J. Sellanes, H.H. Sepúlveda, W. Stotz, F. Tala, A. Thomas, C.A. Vargas, J.A. Vásquez & A. Vega. 2007. The Humboldt Current System of northern and central Chile. Oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 45: 195-344.

Vega M.A., F.J. Rocha, A. Guerra & C. Osorio. 2002. Morphological differences between the Patagonian squid *Loligo gahi* populations from the Pacific and Atlantic Oceans. *Bulletin of Marine Science* 71 (2): 903-913.

CAPÍTULO IV

Artículo en preparación

Patrones genéticos en calamares con historias de vida contrastantes

Christian M. Ibáñez^{1,2}, Luis A. Cubillos² & Elie Poulin¹

1 Laboratorio de Ecología Molecular, Instituto de Ecología y Biodiversidad,
Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las
Palmeras 3425 Ñuñoa, Santiago, Chile.

*Email: ibanez.christian@gmail.com

2 Laboratorio de Evaluación de Poblaciones Marinas, Departamento de Oceanografía,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción,
Concepción, Chile.

Resumen

Las características de historia de vida de los animales marinos es determinante en sus patrones de estructura y diversidad genética. Los calamares pelágicos oceánicos de la familia Ommastrephidae y las especies neríticas de la familia Loliginidae se caracterizan por estrategias de historia de vida contrastantes, así las características diferenciales entre estos calamares son el desove bentónico y menor capacidad de natación de los loliginidos, mientras que los omastrefidos se caracterizan por su desove oceánico y un

mayor potencial de dispersión. Para este estudio las especies modelo en el sistema de corrientes de Humboldt son los calamares *Dosidicus gigas* (Ommastrephidae) y *Doryteuthis gahi* (Loliginidae). Para determinar la estructura poblacional y diversidad genética de ambas especies de calamares se colectaron ejemplares de diferentes sitios en el sistema de corrientes de Humboldt (Perú-Chile), para obtener secuencias del gen mitocondrial COI. Así, para cada especie se calculó la diversidad genética, tamaño efectivo y se realizaron los análisis estadísticos pertinentes para determinar si existe una estructuración poblacional. Además se calculó el tamaño muestral y se compararon ambas especies en términos de diversidad genética y estructura poblacional. En el caso de *D. gigas* no se encontró estructuración espacial, mientras que *D. gahi* se encuentra estructurado en dos unidades poblacionales, una que corresponde a los ejemplares capturados en Perú y la otra de los colectados en Chile. Los valores de F_{ST} fueron órdenes de magnitud distintos entre especies. La diversidad genética resultó distinta tanto entre especies y áreas geográficas como en la interacción de ambos factores. Corroboramos que las características diferenciales de historia de vida en conjunto con el uso de hábitat de los calamares pueden ser determinantes en la estructura y diversidad genética de las poblaciones.

Palabras claves: COI, diversidad genética, historias de vida, Cephalopoda.

Introducción

Las características biológicas y ecológicas de los organismos afectan la capacidad de dispersión y al flujo genético de sus poblaciones. Así, animales con poco movimiento están divididos en pequeñas poblaciones genéticamente distintas; mientras que el flujo genético es mayor en los animales más móviles (Futuyma 2009). Sin embargo, los animales sésiles o poco móviles tienen otras estrategias de dispersión que les permiten colonizar sitios lejanos (e.g., propágulos, larvas, esporas, semillas) (Kinlan & Gaines 2003). Las distintas estrategias de historia de vida de los animales marinos son determinantes en sus patrones de conectividad geográfica y diversidad genética. Por ejemplo, algunas especies de gastrópodos con larvas planctónicas carecen de estructura genética y tienen una mayor diversidad genética comparados con las especies de desarrollo directo (Kyle & Boulding 2000, Johnson & Black 2006, Collin et al. 2007, Lee & Boulding 2009). Además, la estructura geográfica en especies con larvas planctónicas puede reflejar procesos contemporáneos, mientras que los quiebres geográficos en las especies con desarrollo directo manifiestan procesos históricos (Pech et al. 2009). Esto se explica porque los requerimientos de hábitat pueden influenciar no solo el grado de estructura genética sino que también la localización de los quiebres, los que pueden cambiar en una escala evolutiva (Pech et al. 2009).

En el Sistema de Corrientes de Humboldt (SCH) se han reportado varios organismos que presentan homogeneidad o heterogeneidad genética, asociada a sus estrategias de historia de vida. En el caso de especies que tienen una larva planctónica de larga duración (varias semanas), como en el cangrejo *Cancer setosus*, y el gastrópodo *Concholepas concholepas* no se ha detectado estructuración genética espacial (Gomez-

Uchida et al. 2003, Cárdenas et al. 2009a). Un patrón similar ha sido observado en peces que poseen un amplio rango geográfico como la merluza chilena *Merluccius gayi gayi* y el jurel *Trachurus murphyi* (Galleguillos et al. 2000, Cárdenas et al. 2009b). Por el contrario, las algas *Lessonia nigrescens* y *Mazaella laminarioides*, y los moluscos *Chorus giganteus* y *Argopecten purpuratus* tienen una fuerte estructuración geográfica asociadas con su reducido potencial de dispersión (Faugeron et al. 2001; Gajardo et al. 2002; Faugeron et al. 2005, Tellier et al. 2009). A pesar de estos hallazgos en SCH no se han realizado estudios comparativos entre taxa relacionadas que tengan distintas características de historia de vida y que co-habiten en un mismo ecosistema. En este estudio comparamos la estructura poblacional y la diversidad genética entre las dos especies de calamares más abundantes que se distribuyen en todo el SCH. Dentro de los cefalópodos los calamares son interesantes modelos de estudio porque tienen una corta vida, altas tasas metabólicas, amplios rangos geográficos y poseen paralarvas planctónicas (Boyle & Rodhouse 2005). Algunas de estas características pueden explicar por qué ciertas especies de calamares poseen estructura espacial y otras no.

Las estrategias reproductivas de los cefalópodos han sido clasificadas en cinco categorías basadas en el tipo de ovulación, patrón de desove y el crecimiento en el periodo de desove (Rocha et al. 2001). Así, los calamares de la familia Ommastrephidae, son esencialmente monocíclicos, y algunas especies pueden desovar sus huevos en tandas; mientras la mayoría de los calamares de la familia Loliginidae, poseen un desove terminal (Rocha et al. 2001). Los calamares loliginidos son neríticos y su desove ocurre en el fondo marino poniendo sus huevos en algas o corales blandos; mientras los

ommastrefidos son oceánicos y desovan masas de huevos pelágicos (O'Dor 1998). Existen profundas consecuencias ecológicas de estos modos de desove de los cefalópodos (bentónicos o pelágicos). Los huevos depositados en el fondo marino están expuestos a los cambios en las condiciones físicas impuestas por las masas de aguas y tanto las paralarvas como los juveniles son transportados y dispersados por corrientes costeras (Boyle and Rodhouse 2005). Contrariamente, los huevos pelágicos pueden ser transportados geográficamente más lejos debido al transporte advectivo y las corrientes oceánicas (Bower 1996). En SCH los calamares más comunes y abundantes de esas familias corresponden a *Dosidicus gigas* (Ommastrephidae) y *Doryteuthis gahi* (Loliginidae). Estos calamares son contrastantes en tamaño corporal, desove, uso de hábitat y patrones de migración (Tabla 4.1).

Con respecto a los antecedentes genéticos de estas especies de calamares, se ha encontrado en el Atlántico suroeste que *D. gahi* presenta altos valores de diversidad genética y una ausencia de estructura poblacional en una pequeña escala espacial (c.a., 100s km) (Shaw et al. 2004). En cambio en el océano Pacífico *D. gigas* muestra niveles mucho más bajos de diversidad genética y estructura poblacional a una gran escala espacial (c.a., 1000s km) (Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). Los bajos niveles de diversidad genética en animales marinos son inusuales y generalmente ocurren en poblaciones que han pasado por drásticas reducciones en el tamaño poblacional, cuellos de botella o eventos fundadores o que están en procesos de expansión demográfica; mientras que los altos niveles de diversidad genética son indicativos de una estabilidad poblacional o de procesos de extinción y re-colonización (Grant & Bowen 1998;

Carvalho & Nigmatullin 1998; Hoelzel 1999; Lecomte et al. 2004; Freeland 2005). Dentro de los factores que afectan la diversidad genética uno de los más importantes es la reducción en el tamaño de las poblaciones (Gilliespie 1998, Freeland 2005). En este aspecto los calamares se caracterizan por exhibir variaciones interanuales en su distribución y abundancia relacionadas a los cambios oceanográficos (Boyle & Boletzky 1996). Basándose en las estadísticas pesqueras de *D. gigas* y *D. gahi* en los últimos 30 años se ha postulado, tanto en Chile como en Perú, que las condiciones ambientales especialmente los eventos de El Niño y La Niña juegan un rol importante en la abundancia de estas especies. Precisamente un evento El Niño, con aumento de temperatura del mar, tiene un efecto negativo en las capturas de estos calamares, mientras que La Niña con bajas temperaturas del mar, tiene un efecto positivo (Villegas 2001; Rodhouse 2001; Anderson & Rodhouse 2001; Taibe et al. 2001; Waluda & Rodhouse 2006). Estas variaciones inter-anales relacionadas con los eventos ENSO es consistente con los desembarques de *D. gigas* en Perú y Chile, pero en el caso de *D. gahi* se aprecia que los cambios temporales no son tan agudos y este patrón podría dar cuenta de una dinámica poblacional más persistente. De la misma forma en el hemisferio norte se han registrado respuestas poblacionales opuestas frente a las mismas variaciones oceanográficas (NAO) en dos especies distintas de calamares (Omastréfido versus Loliginido) (Dawe et al. 2007).

Los antecedentes relacionados con la historia de vida de los calamares permiten hacer predicciones sobre la estructura genética espacial; mientras que los antecedentes de la dinámica poblacional y las variaciones climáticas ayudan en la inferencia de su

historia demográfica. Así en este capítulo se ponen a prueba las hipótesis planteadas en el capítulo 1 en las cuales se compara la estructura poblacional y la diversidad genética de estas dos especies de calamares.

Materiales and métodos

Alrededor de 30 muestras de tejido de los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* fueron colectadas en 6 sitios de Perú y Chile entre 2005 y 2008 (ver Capítulos 2 y 3). El ADN fué extraído siguiendo el protocolo de extracción salino de Alhjanabi & Martinez (1997). Se usaron los partidores universales y protocolo del ciclo PCR, descritos por Folmer et al. (1994) para amplificar el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI). Las amplificaciones de PCR se pueden revisar en los Capítulos 2 y 3. Los productos de PCR fueron secuenciados en la empresa MacroGen Inc. (Korea). Finalmente, las secuencias fueron editadas y alineadas a ojo usando el programa ProSeq version 2.9 (Filatov 2002).

Para detectar estructura poblacional en cada especie de calamar, se calculó el índice F_{ST} entre las localidades muestreadas con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Estos índices de fijación F_{ST} fueron comparados entre especies por medio de un test de t basado en un Bootstrap no-paramétrico con 50000 iteraciones en el programa Rndom Pro versión 3.14 (Jadwiszczak 2009).

Análisis previos (ver capítulos 2 y 3) indican la existencia de dos poblaciones de *D. gahi*, por lo tanto se estimó la diversidad haplotípica en dos áreas Humboldt norte (norte de Perú – Coquimbo, Chile) y Humboldt sur (Sur de Coquimbo – Chiloé). Esta

clasificación se realizó para ambas especies para poder balancear el modelo. La diversidad haplotípica (H_d , Nei & Tajima 1981) fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$H_d = n (1 - \sum p_i^2) / n - 1$$

donde n es el número de secuencias y p_i es la frecuencia de los i th haplotipos. El promedio y sus intervalos de confianza del 95% de H_d para cada especie de calamar en cada área geográfica fue estimada por medio de una rutina de bootstrapping no-paramétrico con reemplazo en una matriz de presencia-ausencia de haplotipos (columnas) por individuos (filas) 1000 veces en cada área geográfica (Humboldt norte y sur). Esta rutina fue implementada en una hoja de Excel con visual basic (Ibáñez, Yamashiro, Cubillos, Poulin, en preparación) y los pseudovalores de diversidad obtenidos fueron comparados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) entre especies y áreas geográficas (Gotelli & Ellison 2004) en el programa Statistica versión 8.0 (Statsoft 2001).

Para comparar el número esperado de haplotipos construimos curvas de rarefacción mediante el algoritmo de Mao Tau (Colwell et al. 2004) de una matriz de presencia-ausencia de haplotipos (columnas) por individuos (filas) en el programa EstimateS 8.2 (Colwell 2009). Además ajustamos la curva no-lineal de Clench (Soberón & Llorente 1993):

$$S_{(e)} = ae / (1 + be)$$

donde $S_{(e)}$ es el número de especies encontradas por unidad de esfuerzo (número de secuencias) (e); a y b son el intercepto y la pendiente del ajuste. Luego se ajustaron

los datos de cada curva por medio del método de Simplex & Quasi Newton en el programa Statistica 8.0 (Statsoft 2001). Para averiguar el tamaño muestral necesario (con un 95% de confianza) para obtener el número teórico máximo de haplotipos (a/b) que se pueden encontrar en cada especie de calamar:

$$n_{95} = 0.95 (b (1-95))$$

Así mismo calculamos la calidad del muestreo mediante la proporción de haplotipos encontrados:

$$S(e) / (a/b)$$

Al examinar las curvas de rarefacción y sus intervalos de confianza entre áreas geográficas se puede determinar si existen o no diferencias entre el número de haplotipos encontrados (Colwell et al. 2004).

Resultados

Se encontraron altos valores de F_{ST} entre las localidades más extremas del muestreo de *D. gahi*; mientras que en todas las comparaciones de *D. gigas* los bajos valores de F_{ST} fueron varios órdenes de magnitud más bajos comparativamente. Al comparar los valores de F_{ST} entre ambas especies de calamares encontramos diferencias significativas ($t = -0.19$, $P = 0.0008$), ya que en promedio los valores de F_{ST} de *D. gahi* fueron mayores que los de *D. gigas* (0.199 y 0.000261, respectivamente) (Figura 4.1).

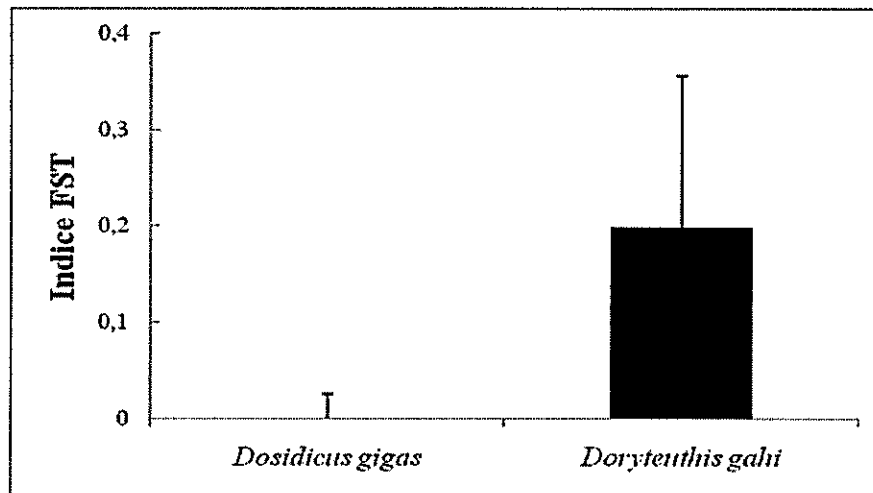


Figura 4.1 Valores promedio de F_{st} de ambas especies de calamares en SCH. Las barras representan desviaciones estándar.

La diversidad genética de *D. gahi* fue más baja en Humboldt norte ($Hd = 0,42$) que en Humboldt sur ($Hd = 0,78$). En cambio en *D. gigas* se encontró un patrón inverso, la diversidad genética fue mayor en Humboldt norte ($Hd = 0,44$) que en Humboldt sur ($Hd = 0,27$) (Fig. 4.2). El análisis de varianza del modelo lineal (MLG) detectó diferencias significativas entre especies, áreas geográficas y en la interacción de ambos factores (Tabla 4.1). Los valores de F de Fisher fueron más altos en la interacción, por lo tanto este factor es el que explica el 85% de la varianza del modelo (Tabla 4.1).

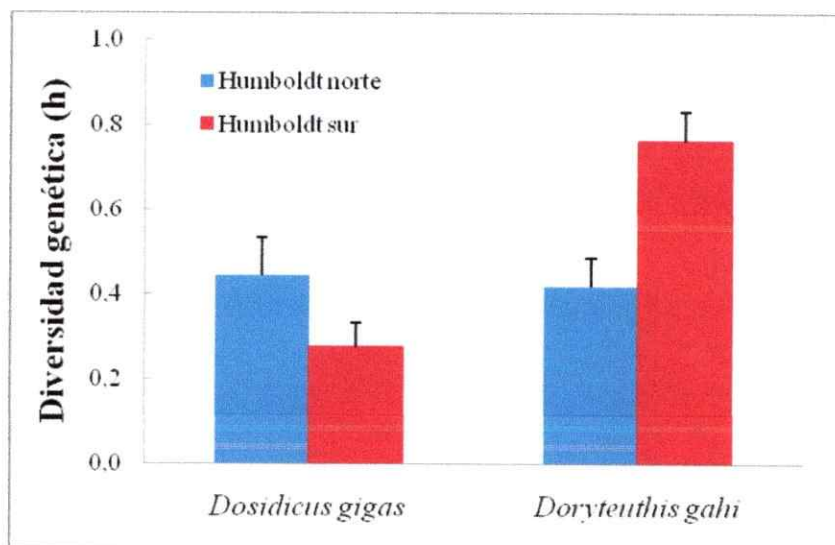


Figura 4.2 Diversidad genética de ambas especies de calamares en SCH. Las barras representan desviaciones estándar.

Tabla 4.1. Resultados del Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	P
Intercepto	1	901,5546	170498,6	< 0,001
Especie	1	53,5251	10122,5	< 0,001
Lugar	1	7,8939	1492,9	< 0,001
Especie*Lugar	1	66,5263	12581,2	< 0,001
Error	3996	0,0053		

Un total de 15 haplotipos fueron encontrados en el fragmento de 683 bp de COI en los 116 individuos de *D. gahi* examinados. La curva de rarefacción muestra que el

esfuerzo muestral en Humboldt norte no ha alcanzado una asíntota, por lo tanto no es adecuado para describir la diversidad genética; mientras que en Humboldt sur la curva alcanza la asíntota rápidamente (Fig. 4.3). Esto ocurre porque en el caso de Humboldt norte se espera que el número de haplotipos siga aumentando si obtenemos más secuencias; mientras que en el caso de Humboldt sur se han encontrado todos los haplotipos con muy pocas muestras. Al ajustar el modelo no-lineal de Clench, se puede inferir para el caso de las muestras de Perú que con esta curva se podrían encontrar un total de 18 haplotipos de los 10 observados si aumentamos a 975 secuencias de ADN. Además con los datos obtenidos se cuenta con un 54% de representatividad de la diversidad genética. Los datos de Chile tienen un 95% de representatividad y si aumentamos el número de secuencias de 58 a 98 podríamos encontrar el mismo número de haplotipos (6). El hecho de que ambas curvas solapan sus IC 95% permite determinar que no hay diferencias en términos de número de haplotipos entre Humboldt norte y sur (Fig. 4.3).

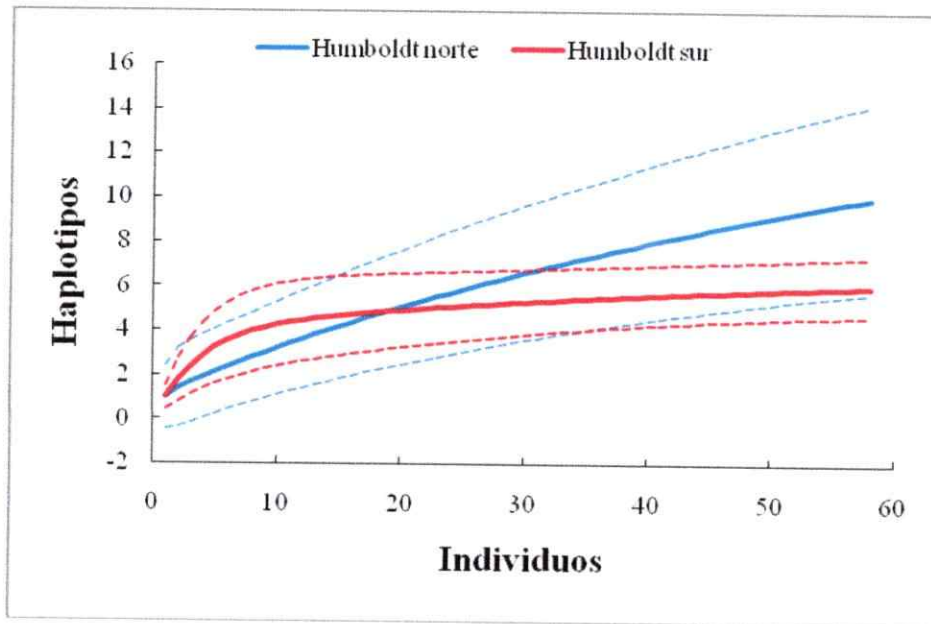


Figura 4.3 Curvas de rarefacción de *D. gahi* en SCH.

En *D. gigas* encontramos un total de 23 haplotipos en el fragmento 657 bp de COI en los 169 individuos examinados. La curva de rarefacción muestra una relación casi lineal entre el número de haplotipos y el número de secuencias en ambos lugares (Fig. 4.4). Al ajustar el modelo no-lineal de Clench se puede inferir que con esta curva se podrían encontrar hasta un total de 23 y 25 haplotipos si aumentamos a 1220 y 1976 secuencias de ADN, respectivamente. Además, con los datos obtenidos se cuenta solo con un 48% y 65% de representatividad de la diversidad genética. Las curvas de rarefacción de ambas áreas no muestran diferencias en el número de haplotipos ya que solapan sus IC 95% (Fig. 4.4).

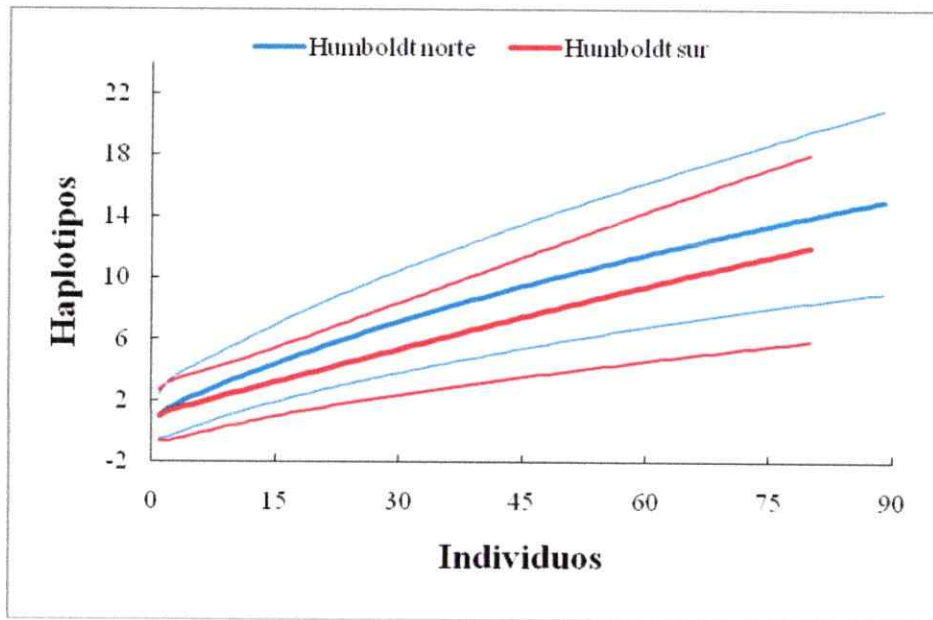


Figura 4.4 Curvas de rarefacción de *D. gigas* en SCH.

Comparativamente estos resultados muestran que el número de haplotipos es menor en *D. gahi*, ya que tiene varios haplotipos frecuentes y muy pocos raros (Fig. 4.5); mientras que *D. gigas*, tiene un mayor número debido a que hay un exceso de haplotipos raros y uno muy frecuente (Fig. 4.6).

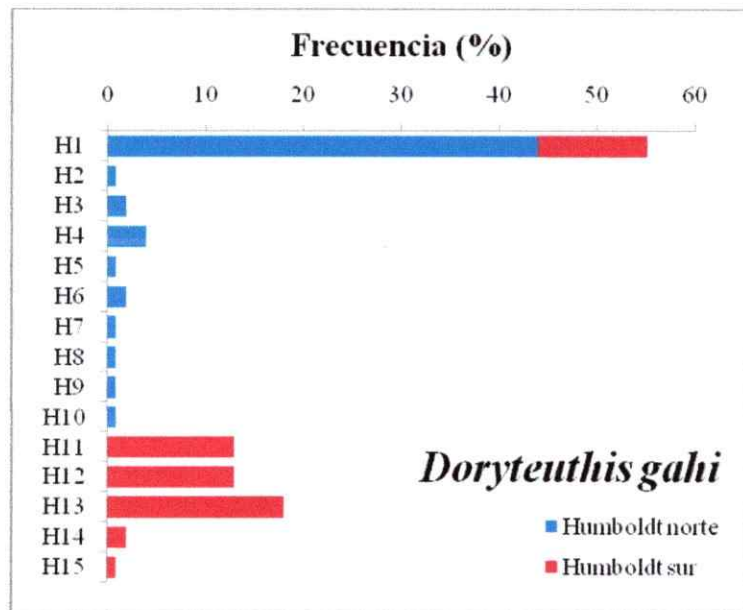


Figura 4.5 Frecuencia de los haplotipos encontrados en *D. gahi*.

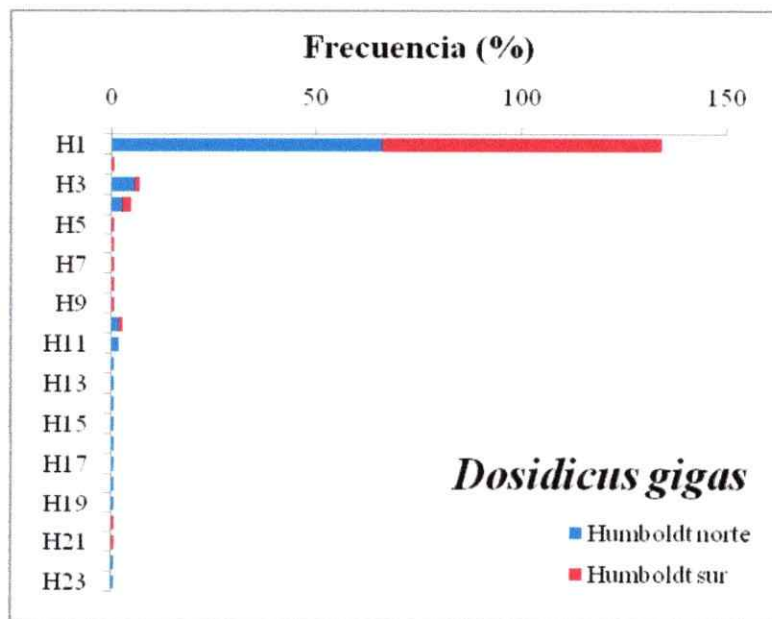


Figura 4.6 Frecuencia de los haplotipos encontrados en *D. gigas*.

Discusión

En este estudio confirmamos que las distintas estrategias de historia de vida de los calamares tienen importantes implicancias genéticas. El calamar nerítico *D. gahi* presenta altos valores de F_{ST} , debido a su desove bentónico y bajo potencial de dispersión; mientras que en *D. gigas* se encontraron valores bajos de F_{ST} , consecuencia de su alta capacidad migratoria y a la presencia de masas de huevos pelágicos. La mayoría de las especies de calamares omastreífidios muestran estructuración genética a grandes escalas espaciales (e.g., Brierley et al. 1993, Katugin 2002, Triantafillos et al. 2004, Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010), mientras revelan una ausencia o débil estructura genética poblacional entre sitios muy cercanos (c.a. 600 km, Adcock et al. 1999, Sandoval-Castellanos et al. 2007, 2010). De la misma manera los calamares loliginídeos presentan una marcada heterogeneidad y/o homogeneidad genética dependiendo de la escala espacial (e.g., Carvalho & Loney 1989, Brierley et al. 1995, Reichow & Smith 2001, Herke & Foltz 2002, Shaw et al. 2002, 2004, Buresch et al. 2006, Aoki et al. 2008, Shaw et al. 2010), pero a diferencia de los omastreífidios los calamares loliginídeos son neríticos y están más influenciados por procesos locales como son las desembocaduras de grandes ríos o cambios abruptos del fondo marino, los que funcionan como barreras al flujo genético (et al. 1995; Shaw et al. 1999, Herke & Foltz 2002, Semmens et al. 2007). El potencial de dispersión es clave en determinar la estructura geográfica de los calamares, en el caso de *D. gigas* su gran potencial de dispersión asociado a su gran tamaño corporal (> 2 m Longitud total) y alta capacidad

natatoria (> 20 km/h) le permite migrar distancias sobre los 1000 km en el SCH, tanto latitudinal como longitudinal (Nesis 1970, Nigmatullin et al. 2001, Ibáñez & Cubillos 2007). En cambio *D. gahi* es de un menor tamaño corporal (< 50 cm Longitud total) y por su reducido ámbito de hogar (plataforma continental) solo realiza migraciones verticales ontogenéticas (Arkhipkin et al. 2000). Otra característica asociada a la dispersión es el tipo de desove de los calamares. El calamar *D. gigas* desova una gran masas gelatinosa de millones de huevos en el ambiente pelágico (Staaf et al. 2008), que puede ser transportada por las corrientes a lugares muy distantes. En cambio *D. gahi* desova en el fondo costero cápsulas que contienen cientos de huevos que adhieren a las algas o corales blandos (Arkhipkin et al. 2000, Villegas 2001). Estas contrastantes historias de vida tienen grandes implicancias en la estructura geográfica de las poblaciones de calamares y permiten hacer predicciones acerca del flujo genético espacial.

En términos metodológicos, el tamaño muestral no fue suficiente para caracterizar la diversidad genética de ambas especies. Es común que en la mayoría de los estudios de ecología (Colwell et al. 2004) y biología evolutiva, incluyendo la genética, no se evalúe el tamaño de la muestra. Esto generalmente porque los muestreos en terreno son costosos y en el caso de los análisis genéticos aún más. Aún así, se debe tener en cuenta que el número de individuos analizados podrían no ser representativos de la diversidad genética de una o varias poblaciones. Este problema se acentúa cuando se tiene una población con muchos haplotipos raros y algunos muy frecuentes, debido tal vez a algún evento demográfico del pasado.

Se encontraron claras diferencias en los patrones de diversidad genética (Hd) entre especies, pero con una fuerte variación geográfica. Esta variación espacial se debe a los distintos efectos que pueden tener los cambios climáticos en cada área geográfica y como responde cada especie. La baja diversidad detectada en Perú en ambas especies de calamares se debe a una expansión demográfica reciente (ver capítulos 2 y 3), mientras que en el caso de Chile la diversidad es alta solo en *D. gahi*. Considerando las diferencias en el potencial de dispersión de cada especie de calamar, y su historia evolutiva esta diferenciación geográfica en la diversidad genética se puede explicar con los resultados de los análisis de la historia demográfica.

Sandoval-Castellanos et al. (2010) proponen la hipótesis que el ancestro de *D. gigas* habría tenido un tamaño corporal grande (como en el presente) y probablemente una distribución trans-oceánica (como otras especies de ommastreídeos en el presente) durante el Plioceno y parte Pleistoceno cuando las condiciones oceanográficas de ambos lados del Pacífico (este y oeste) eran similares. Además, la evidencia paleontológica sugiere que este género podría tener un origen en el hemisferio norte ya que se ha descrito una especie en California *Dosidicus lomita* Clarke & Fitch 1979 de finales del Plioceno (aproximadamente 3 millones de años) (Clarke & Fitch 1979). En este contexto planteó que en el caso de *D. gigas*, esta especie habría invadido Perú-Chile recientemente en los últimos 40000 años desde el hemisferio norte (Figura 4.7).

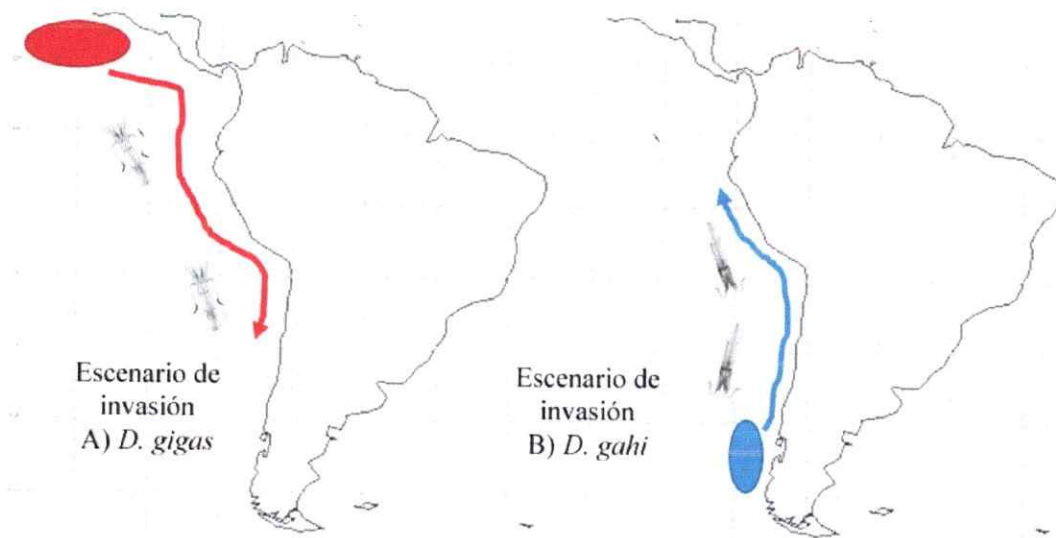


Figura 4.7 Escenario hipotético de la invasión geográfica de *D. gigas* y *D. gahi* en el Pleistoceno. Las elipses de colores representan la población ancestral.

En el caso de *D. gahi* los resultados de la historia demográfica encontrados en el capítulo 3 sugieren que esta especie invadió el norte de Chile y Perú desde el sur de Chile hace por lo menos unos 40000 años atrás.

La población de *D. gahi* del sur de Chile podría haber pasado por varios eventos de extinción y recolonización de varias fuentes poblacionales distintas, incluyendo la población del Atlántico, lo que habría facilitado una mezcla de haplotipos y la mantención de una alta diversidad genética.

Literatura citada

Adcock G.J., P.W. Shaw, P. G. Rodhouse & GR. Carvalho. 1999. Microsatellite analysis

of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* during a period of intensive fishing. Marine Ecology progress Series 187: 171-178.

Anderson C.I.H. & P. Rodhouse. 2001. Life cycles, oceanography and variability: ommastrephid squid in variable oceanographic environments. Fisheries Research 54: 133-143.

Arkhipkin A.I., Laptikhovsky V.V. & Middleton D.A.J. 2000. Adaptations for cold water spawning in loliginid squid: *Loligo gahi* in Falkland waters. Journal of Molluscan Studies 66: 551-564.

Bower, J.R. (1996) Estimated paralarval drift and inferred hatching sites for *Ommastrephes bartrami* (Cephalopoda, Ommastrephidae) near the Hawaiian Archipelago. Fishery Bulletin 94: 398-411.

Boyle P.R. & S.V. Boletzky 1996. Cephalopod populations: definition and dynamics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B. 351: 985-1002.

Boyle PR, Rodhouse PG (2005) Cephalopods: ecology and fisheries. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company Editorial offices: Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ

Brierley A.S., Rodhouse P.G., Thorpe J.P., Clarke M.R. (1993) Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonian Shelf and the Antarctic Polar Frontal Zone. Marine Biology 116: 593-602.

Brierley A.S., Thorpe J.P., Pierce G.J., Clarke M.R., Boyle P.R. (1995) Genetic

- variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginidae) in the northeast Atlantic Ocean. *Marine Biology* 122: 79–86.
- Buresch K. C., Gerlach G. & R. T. Hanlon. 2006. Multiple genetic stocks of longfin squid *Loligo pealeii* in the NW Atlantic: stocks segregate inshore in summer, but aggregate offshore in winter. *Marine Ecology Progress Series* 310: 263–270.
- Cárdenas L, Castilla JC, Viard F (2009a) A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *J Biogeo* 36:969-981
- Cárdenas L, Silva AX, Magoulas A, Cabezas J, Poulin E, Ojeda FP (2009b) Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South-eastern Pacific Ocean. *Fish Res* 100:109-115
- Carvalho G.R. & Ch.M. Nigmatullin. 1998. Stock structure analysis and species identification. En: Squid recruitment dynamics. The genus *Illex* as a model. The commercial *Illex* species. Influences on variability. Rodhouse P.G., Dawe E.G. & O'Dor R.K. (eds.). FAO Fisheries Technical Paper 376: 199-232.
- Carvalho G.R. & K.H. Loney. 1989. Biochemical genetic studies on the Patagonian squid, *Loligo gahi* d'Orbigny. I. electrophoretic survey of genetic variability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126: 231-241.
- Carvalho G.R., Pitcher T.J. (1989) Biochemical genetic studies on the Patagonian squid *Loligo gahi* d'Orbigny. II. Population structure in Falkland waters using isozymes, morphometrics and life history data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126:243–258.

- Carvalho G.R., Thompson A., Stoner A.L. (1992) Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid, *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 158:105–121.
- Clarke M.R., Fitch J.E (1979) Statoliths of the Cenozoic teuthoid cephalopods from North America. *Palaeontology* 22: 479-511.
- Collin R, O.R. Chaparro, F. Winkler, D. Véliz. 2007. Molecular phylogenetic and embryological evidence that feeding larvae have been reacquired in a marine gastropod. *Biol. Bull.* 212: 83–92.
- Colwell, R.K. 2009. EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples (Software and User's Guide), Versión 8.2. Disponible en <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Colwell, R.K., C.X. Mao, J. Chang. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* 85: 2717-2727.
- Dawe E.G., Hendrickson L.C., Colbourne E.B., Drinkwater K.F. & M.A. Showell. 2007. Ocean climate effects on the relative abundance of shortfinned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealeii*) squid in the northwest Atlantic Ocean. *Fisheries Oceanography* 16:4, 303–316.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50
- Faugeron S., Martínez E.A., Correa J.A. & Billot C. 2005. Long-term copper mine waste disposal in northern Chile associated with gene flow disruption of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens*. *Marine Ecology Progress Series* 288: 129–140.

- Faugeron S., Valero M., Destombe C., Martinez E.A. & Correa J.A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37: 705–716.
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Futuyma, D.J. 2009. *Evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gajardo G., Cancino J.M. & Navarro J.M. 2002. Genetic variation and population structure in the marine snail *Chorus giganteus* (Gastropoda: Muricidae), an overexploited endemic resource from Chile. *Fisheries Research* 55: 329–333.
- Galleguillos, R., Troncoso, L., Oyarzún, C., Astorga, M. & Peñaloza, M. 2000. Genetic differentiation in Chilean hake *Merluccius gayi gayi* (Pisces: Merlucciidae). *Hydrobiologia* 420: 49–54.
- Gillespie J.H. 1998. *Population genetics*. The Johns Hopkins University Press, London. 174 pp.
- Gomez-Uchida, D., Weetman, D., Hauser, L., Galleguillos, R. & Retamal, M. 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. *Journal of Crustacean Biology* 23: 486–494.
- Gotelli N.J., A.M. Ellison. 2004. *A primer of ecological statistics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Herke SW, Foltz DW (2002) Phylogeography of two squid (*Loligo pealei* and *L. plei*) in the Gulf of Mexico and northwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology* 140:103–

- Hoelzel A.R. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 23–39.
- Ibáñez C.M. & L.A. Cubillos. 2007. Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. *Scientia Marina* 71(1): 123-128.
- Jadwiszczak P (2009) Rndom Pro 3.14. Software for classical and computer-intensive statistics available free from the New Rndom Site (<http://pjadw.tripod.com>).
- Johnson M.S., R. Black. 2006. Effects of mode of reproduction on genetic divergence over large spatial and temporal scales in intertidal snails of the genus *Bembicium Philippi* (Gastropoda: Littorinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 2006, 89: 689–704.
- Kinlan, B.P. and S.D. Gaines. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology* 84(8):2007-2020.
- Katugin ON (2002) Patterns of genetic variability and population structure in the North Pacific squids *Ommastrephes bartramii*, *Todarodes pacificus*, and *Berryteuthis magister*. *Bulletin of Marine Science* 71:383–420.
- Kyle, C. and E.G. Boulding. 2000. Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology* 137: 835-845.

- Lecomte F., W.S. Grant, J.J. Dodson, R. Rodríguez-Sánchez & B.W. Bowen. 2004. Living with uncertainty: genetics imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology* 13: 2169-2182.
- Lee H.J., E.G. Boulding. 2009. Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology* 18, 2165–2184.
- Nei M., F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Nigmatullin Ch.M., K.N. Nesis & A.I. Arkhipkin. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research* 54: 9-19.
- O'Dor, R.K. 1998. Squid life-history strategies. In: Squid recruitment dynamics, FAO Fisheries Technical Paper. No. 376
- O'Dor R.K. & D.M. Webber. 1991. Invertebrates athletes: Tradeoffs between transport efficiency and power density in cephalopod evolution. *Journal of Experimental Biology* 160: 93-112.
- Pelc R.A., R.R. Warner, S. D. Gaines. 2009. Geographical patterns of genetic structure in marine species with contrasting life histories *Journal of Biogeography* 36: 1881-1890.
- Reichow D, Smith MJ (2001) Microsatellites reveal high levels of gene flow among

- populations of the California squid *Loligo opalescens*. *Molecular Ecology* 10:1101–1110.
- Rocha F., Guerra A. & González A.F. 2001. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Review* 76: 291-304.
- Rodhouse P.G. 2001. Managing and forecasting squid fisheries in variable environments. *Fisheries Research* 54: 3-8.
- Sandoval-Castellanos E., Uribe-Alcocer M. & Díaz-Jaimes P. 2007. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fisheries Research* 83: 113–118.
- Sandoval-Castellanos E., Uribe-Alcocer M. & Díaz-Jaimes P. 2010. Population genetic structure of Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) inferred by mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 385: 73–78.
- Semmens J.M., Pecl G.T., Gillanders B.M., Waluda C.M., Shea E.K., Jouffre D., Ichii T. Zumholz K., Katugin O.N., Leporati S.C. & P.W. Shaw. 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Review in Fish Biology and Fisheries* 17:401–423.
- Shaw P.W., G.J. Pierce & P.R. Boyle. 2004a. Subtle population structure within highly vagile marine invertebrate, the veneid squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 407-417.
- Shaw P.W., Adcock G.J., Burnett W.J., Carvalho G.R., & Arkhipkin A.I. 2004b. Temporally distinct spawning cohorts and geographically distinct spawning aggregations within the Patagonian squid *Loligo gahi* do not represent genetically

- differentiated sub-populations. *Marine Biology* 144:961–970
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the Veined Squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8:407–417.
- Shaw PW, Hendrickson L, McKeown LJ, Stonier T, Naud M-J, Sauer WHH (2010) Discrete spawning aggregations of loliginid squid do not represent genetically distinct populations. *Marine Ecology Progress Series* 408: 117–127
- Soberón, J. & J. Llorente. 1993. The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conserv. Biol.*, 7: 480-488.
- StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Taibe A., C. Yamashiro, L. Mariategui, P. Rojas & C. Roque. 2001. Distribution and concentrations of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) off Peruvian coast between 1991 and 1999. *Fisheries Research* 54: 21-32.
- Tellier F., A.P. Meynard, J.A. Correa, S. Faugeron, M. Valero. 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry?. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 679–693.
- Thiel M., Macaya E., Acuña E., Arntz W., Bastias H., Brokordt K., Camus P., Castilla J.C., Castro L.R., Cortés M., Dumont C.P., Escribano R., Fernández M., Lancellotti D., Gajardo J.A., Gaymer C.F., Gomez I., González A.E., González H.E., Haye P.A., Illanes J.E., Iriarte J.L., Luna-Jorquera G., Luxoro C.,

- Manríquez P.H., Marín V., Muñoz P., Navarrete S.A., Pérez E., Poulin E., Sellanes J., Sepúlveda A., Stotz W., Tala F., Thomas A., Vargas C.A., Vásquez J.A. & A. Vega.2007. The Humboldt Current System of northern and central Chile. Oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 45: 195-344.
- Triantafillos L, Adams M (2001) Allozyme analysis reveals a complex population structure in the southern calamari *Sepioteuthis australis* from Australia and New Zealand. *Marine Ecology Progress Series* 212:193–209
- Villegas P. 2001. Growth, life cycle and fishery biology of *Loligo gahi* (d'Orbigny 1835) off the Peruvian coast. *Fisheries Research* 54: 123-131.
- Waluda CM, Yamashiro C, Rodhouse PG (2006) Influence of the ENSO cycle on the light-fishery for *Dosidicus gigas* in the Peru Current: An analysis of remotely sensed data. *Fish Res* 79:56–63.

CAPITULO V: DISCUSIÓN GENERAL

En este capítulo se discute en relación a las hipótesis planteadas originalmente en base a los resultados encontrados.

Hipótesis 1:

“Los calamares *Dosidicus gigas* y *Doryteuthis gahi* deberían presentar patrones distintivos de estructura genética espacial en el Sistema de Corrientes de Humboldt, dadas sus estrategias de historia de vida contrastantes (e.g., tamaño corporal, tipo de desove, potencial de dispersión)”.

En base a los resultados expuestos en los capítulos anteriores “existe evidencia parcial para no rechazar la hipótesis 1”, ya que se cumplen las predicciones de que *D. gigas* presenta una ausencia de estructura genética espacial, mientras que *D. gahi* es una especie compuesta de dos unidades poblacionales, por lo menos en HCS.

Las historias de vida de cada especie de calamar tienen una gran influencia en los patrones de estructura genética poblacional. Así, las especies de pequeño tamaño corporal con desove bentónico y costero tienen un menor potencial de dispersión comparativamente con las especies de gran tamaño y que tienen un desove oceánico pelágico. Este resultado es muy concordante con el paradigma del tipo de larvas de los invertebrados marinos en general, ya que postula que los animales con larvas planctónicas no muestran estructura genética espacial; mientras que los invertebrados con desarrollo directo tienen estructura espacial a pequeñas escalas espaciales (Collin et

al. 2007, Thiel et al. 2007, Lee & Boulding 2009).

Hipótesis 2:

“Durante el Pleistoceno tardío, la alternancia de periodos glaciales e interglaciales en el Sistema de Corrientes de Humboldt estarían asociado a cambios en los patrones de distribución y abundancia de ambas especies de calamares (*D. gigas* y *D. gahi*). Sin embargo, las características de historia de vida contrastantes de estas especies y su utilización diferencial de hábitat determinarían que tipo de proceso demográfico pasado habría ocurrido”.

En este caso en base a los resultados expuestos en los capítulos anteriores “existe evidencia parcial para no rechazar la hipótesis 2”, ya que la diversidad genética y tamaño efectivo poblacional de ambas especies se ven afectadas diferencialmente por los cambios climáticos del Pleistoceno.

Los patrones de diversidad genética y tamaño efectivo poblacional son independientes de las estrategias de historia de vida de los calamares y son dependientes de cómo los procesos poblacionales son influenciados por los cambios climáticos a grandes escales temporales. En el caso del norte del sistema de corrientes de Humboldt, hay una gran cantidad de evidencia paleoceanográfica que describen los cambios en temperatura del mar y productividad a finales del Pleistoceno y durante el Holoceno (Montecino & Lange 2009). Estas fluctuaciones ambientales han dejado huellas en el ADN mitocondrial ya que las poblaciones marinas incrementan o decrecen su tamaño poblacional en función de estas variaciones. Por otro lado, se ha podido evidenciar procesos de migraciones, extinciones locales, re-colonizaciones e invasiones de

poblaciones lejanas a nuevos sitios, que en aquella ventana de tiempo tuvieron mejores condiciones ambientales para el desarrollo de las poblaciones de calamares. En este estudio se evidencia la invasión de *D. gigas* desde la región ecuatorial hacia Perú y Chile, basándose en los resultados genéticos y en las hipótesis propuestas por Sandoval-Castellanos et al. (2010) en cuanto a la historia demográfica y en base a la evidencia paleontológica mencionada en el capítulo 4. Además, recientemente se ha producido una invasión de esta especie en ambos hemisferios, alcanzando en el norte las costas de Alaska (Zeidberg & Robinson 2007) y al sur de Chile (Ibáñez & Cubillos 2007). Estas invasiones se producen por una combinación de factores ecológicos y biológicos, ya que como han propuesto Keyl et al (2008) estas irrupciones poblacionales son el resultado combinado entre migración, crecimiento y maduración; y la influencia del ambiente. También encontramos un patrón de invasión geográfica de *D. gahi* desde el sur de Chile hacia Perú. Los datos genéticos sugieren un evento de efecto fundador que posteriormente habría generado una expansión demográfica consecuencia de mejores condiciones ambientales durante el Pleistoceno.

El marcador molecular elegido (COI) ha permitido poner a prueba las hipótesis propuestas. Este marcador como otros mitocondriales podría estar sujeto a selección, duplicación y se ha criticado su uso en la inferencia demográfica (Bazin et al. 2006, Galtier et al. 2009). Sin embargo, tiene más ventajas que desventajas ya que es más variable dentro de los genes mitocondriales que se utilizan en filogeografía (Galtier et al. 2009). Es de fácil amplificación, mucho más barato que otros marcadores como los microsatélites, y permite evaluar la historia demográfica de las poblaciones en estudio

debido a su herencia materna. Además el objetivo de esta tesis fue la comparación de ambas especies de calamares y para poder lograr este objetivo se utilizó el mismo marcador en las dos especies. Claramente esta aproximación no es tan fina como los microsateles de ADN, pero éstos no han sido desarrollados formalmente para *D. gigas*, mientras que en *D. gahi* se ha usado una combinación entre partidores específicos y algunos de otras especies.

La historia demográfica inferida el modelo de Rogers & Harpending (1992) a través de las distribuciones de diferencias entre secuencias (mismatch distribution) se basa en crecimiento poblacional instantáneo desde cero hacia infinito. En base a los parámetros obtenidos de este crecimiento instantáneo y usando una tasa de mutación de 2% encontramos fechas de expansión demográfica de hace 6,000 años para *D. gigas*. Este modelo ha sido criticado por su simplicidad ya que no toma en cuenta los eventos de coalescencia después de la expansión y por lo tanto sub-estima las fechas de expansión (Schneider & Excoffier 1999, Drummond et al. 2005). Al utilizar el modelo lineal de mínimos cuadrados de Schneider & Excoffier (1999), se encontró una fecha distinta y con intervalos de confianza muy amplios. Por ejemplo, en el caso de *D. gigas* la expansión poblacional habría ocurrido hace 45,261 años (C.I. 95% 0 – 86,360 años). En cambio en los resultados utilizando Bayesian skyline se estimó el tiempo del MRCA hace 40,004 años (HPD 95% 31,932 – 48,176 años) y al observar los cambios temporales en el tamaño efectivo se puede ver que el tamaño poblacional se incrementa varios órdenes de magnitud hace unos 25,000 años. El uso de la inferencia bayesiana permite dar información previa al análisis y además relajar el reloj molecular,

características que permiten evaluar la incerteza y con intervalos de credibilidad como también poder obtener la trayectoria del tamaño efectivo en el tiempo. En el caso de Bayesian Skyline permite reconstruir el tamaño efectivo de la población en el tiempo pasado mediante eventos de coalescencia usando diferentes modelos evolutivos y ecológicos (Drummond et al. 2005). Lamentablemente, aún no se han desarrollado muchos programas estadísticos que permitan estimar los índices de diversidad genética y/o de estructuración poblacional (e.g., F_{ST}) con inferencia bayesiana que puedan ser usados con diferentes marcadores moleculares.

La tasa de mutación elegida 2% es una tasa de divergencia de linajes de cefalópodos y las tasas de poblaciones pueden llegar a ser dos órdenes de magnitud mayores (Ho et al. 2005), lo que implica que si se usa un tasa de mutación cercana al 10% se podrían encontrar tiempos de expansión demográfica cerca de un orden de magnitud menor. De acuerdo al anterior, en vez de encontrar que la expansión fue hace 40000 años aumentando la tasa de mutación a 10% la fecha de expansión podría corresponder a unos 5000 años. A pesar de este problema los intervalos de confianza nos sugieren que hay una gran varianza asociada a estas estimaciones y la corrección de la tasa usada puede incrementar más aún la incerteza (ver resultados de Ho et al. 2005).

Como una forma de resumir la información de la tesis he construido una tabla resumen con las principales preguntas y sus resultados, que se presenta a continuación.

Tabla 5.1 Resumen de las principales preguntas y los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis.

Preguntas	Capítulo	Resultados
¿El calamar <i>Dosidicus gigas</i> presenta estructuración genética espacial en SCH?	II	Los resultados no detectan estructura genética poblacional de <i>D. gigas</i> en SCH.
¿El calamar <i>Dosidicus gigas</i> tiene una baja diversidad genética?	II	Efectivamente encontramos una baja diversidad genética de <i>D. gigas</i> en todas las localidades debido a una marcada señal de expansión demográfica.
¿Cuáles son los efectos de los cambios climáticos del pasado en el tamaño efectivo del calamar <i>Dosidicus gigas</i> ?	II	El tamaño efectivo se incrementa de unos miles a millones de individuos en los últimos 40000 años y es concordante con los registros paleoceanográficos de productividad y temperatura del mar.
¿El calamar <i>Doryteuthis gahi</i> presenta estructuración genética espacial en SCH?	III	Los resultados detectan dos unidades poblacionales de <i>D. gahi</i> en SCH, correspondientes a Perú y Chile.
¿El calamar <i>Doryteuthis gahi</i> tiene una alta diversidad genética?	III	Efectivamente encontramos una baja diversidad genética en <i>D. gahi</i> en la población de Perú, debido a la señal de expansión demográfica; mientras que existe una alta diversidad genética en la población de Chile producto de los eventos de extinción-recolonización.
¿Cuáles son los efectos de los cambios climáticos del pasado en el tamaño efectivo del calamar <i>Doryteuthis gahi</i> ?	III	El tamaño efectivo se incrementa de unos miles a millones de individuos en los últimos 40,000 años en la población de Perú, mientras que se mantiene constante en la población de Chile los últimos 130,000 años.
¿Pueden las distintas historias de vida modificar la estructura genética espacial de ambas especies de calamares?	IV	Efectivamente, el calamar <i>D. gigas</i> no presenta estructura espacial debido a su gran potencial de dispersión consecuencia de su gran tamaño

		corporal y desove pelágico oceánico. En cambio se encontró dos poblaciones de la especie <i>D. gahi</i> efecto de su bajo potencial de dispersión asociado a su desove bentónico.
¿Las distintas historias de vida contrastante de ambas especies de calamares puede modificar la diversidad genética de las poblaciones?	IV	La diversidad genética resultó distinta entre especies y áreas geográficas. El modelo explicó cerca del 85% de la varianza al interactuar ambos factores. Por lo tanto tenemos que la diversidad genética tiene un componente geográfico y otro filogenético asociado a las distintas historias de vida de cada especie de calamar.

Finalmente, enfatizo la necesidad de replicar este estudio incluyendo más especies de cefalópodos con distintas estrategias de historia de vida y en otros ecosistemas de surgencias como California y Sudáfrica. Se esperaría encontrar resultados similares a este estudio, los que apoyarían las hipótesis propuestas inicialmente y permitirían desarrollar otras líneas de investigación asociadas, como por ejemplo, incluir la caracterización detallada de las estrategias de historia de vida. En este último contexto, es de vital importancia conocer como y cuanto se dispersan las paralarvas, los juveniles y los adultos de diferentes especies de calamares. Adicionalmente, este estudio puede ser extrapolado y reforzado por la inclusión de otros tipos de animales tanto invertebrados como vertebrados que posean historias de vidas contrastantes en diferentes ecosistemas de surgencias costeras. Estos estudios deberían ser realizados con diferentes marcadores moleculares para contrastar las diferencias en estructura y diversidad genética en las distintas especies.

Referencias

- Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312:570-572
- Collin R, O.R. Chaparro, F. Winkler, D. Véliz (2007) Molecular phylogenetic and embryological evidence that feeding larvae have been reacquired in a marine gastropod. *Biol. Bull.* 212: 83–92.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22:1185-1192.
- Galtier N., B. Nabholz, S. Glémin, Hurst G.D.D. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541–4550.
- Ho S.Y.W., M.J. Phillips, A. Cooper, A.J. Drummond. 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1561-1568.
- Ibáñez CM, Cubillos LA (2007) Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. *Sci Mar* 71:123-128.
- Lee H.J., E.G. Boulding. 2009. Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology* 18: 2165–2184.

- Keyl F, Argüelles J, Mariátegui L, Tafur R, Wolff M, Yamashiro C (2008) A hypothesis on range expansion and spatio-temporal shifts in size-at-maturity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the eastern Pacific Ocean. *CalCOFI Rep* 49:119-128
- Montecino V, Lange CB (2009) The Humboldt Current System: ecosystem components and processes, fisheries, and sediment studies. *Prog Ocean* 83:65-79
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569
- Sandoval-Castellanos E., Uribe-Alcocer M. & Díaz-Jaimes P. 2010. Population genetic structure of Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) inferred by mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 385: 73–78.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079-1089
- Thiel M., Macaya E., Acuña E., Arntz W., Bastias H., Brokordt K., Camus P., Castilla J.C., Castro L.R., Cortés M., Dumont C.P., Escribano R., Fernández M., Lancellotti D., Gajardo J.A., Gaymer C.F., Gomez I., González A.E., González H.E., Haye P.A., Illanes J.E., Iriarte J.L., Luna-Jorquera G., Luxoro C., Manríquez P.H., Marín V., Muñoz P., Navarrete S.A., Pérez E., Poulin E., Sellanes J., Sepúlveda A., Stotz W., Tala F., Thomas A., Vargas C.A., Vásquez J.A. & A. Vega. 2007. The Humboldt Current System of northern and central Chile. Oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 45: 195-344.

Zeidberg LD, Robison BH (2007) Invasive range expansion by the Humboldt squid,
Dosidicus gigas, in the eastern North Pacific. PNAS 104:12948-12950.

ANEXO 1

Descripción de los índices de diversidad genética

Número de sitios polimórficos (S): número de sitios en las secuencias que presentan diferentes nucleótidos.

Número de haplotipos (K): número total de haplotipos diferentes encontrados en una muestra.

Diversidad haplotípica (Hd): es la probabilidad de que al elegir dos haplotipos al azar, estos sean diferentes.

$$Hd = n (1 - \sum p_i^2) / n - 1$$

donde n representa el número de secuencias y p_i es la frecuencia relativa de los i th haplotipos.

Promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π): indica el número de diferencias promedio que existe entre todos los pares de secuencias de la muestra.

$$\Pi = n (\sum p_i p_j d_{ij}) / n - 1$$

donde n representa el número de secuencias, d es una estimación del número de mutaciones y p es la frecuencia relativa de los haplotipos i y j.