

UCH - FC  
MAG - EBE  
M385  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**Filogeografía comparada en dos Echinoideos del Pacífico Sudeste: *Loxechinus albus* (Molina, 1782) y *Tetrapyrgus niger* (Molina, 1782)**

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

Facultad de Ciencias

**Andrea Paz Martínez Salinas**

Junio 2015

Director de Tesis: Dr. Elie Poulin

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGISTER**

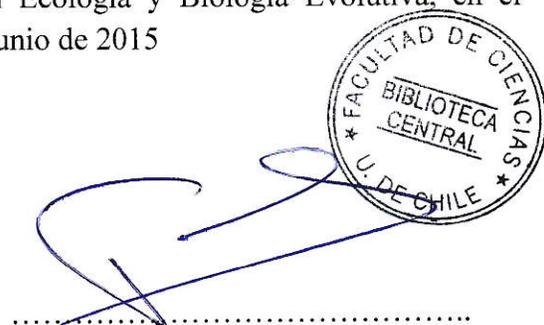
Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister  
presentada por la candidata

**ANDREA PAZ MARTINEZ SALINAS**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al  
grado de Magister en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el  
examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Junio de 2015

Director de Tesis:

Dr. Elie Poulin



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Sylvain Faugeron

Dr. David Véliz



<b>INDICE DE MATERIAS</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Estadios larvales de desarrollo	1
1.2. Potencial de dispersión y conectividad poblacional	2
1.3. Conectividad y estructuración genética poblacional	5
1.4. Área de Estudio	7
1.4.1. Influencia de eventos históricos	10
1.5. Unidad de Estudio: Dos especies de Equinodermos de la Clase Echinoidea	13
1.6. Hipótesis unidad de estudio	18
1.6.1. Paradigma de conectividad de las especies	18
1.6.2. Quiebres genéticos asociado a quiebres biogeográficos	19
1.7. Planteamiento de objetivos	20
1.7.1. Objetivos Generales	20
1.7.2. Objetivos específicos	21

<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>21</b>
2.1. Obtención de muestras	22
2.1.1. Extracción de DNA, amplificación y secuenciación	25
2.2. Análisis poblacionales de las especies	26
2.2.1. Caracterización genética de las poblaciones	26
2.2.1.1. Índices de Diversidad de las especies	26
2.2.1.2. Análisis estructura genética poblacional de las especies	27
2.3. Correspondencia entre quiebres genéticos asociados a quiebres biogeográficos	29
2.4. Inferencia demográfica de las especies	33
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>36</b>
3.1. Análisis de las muestras	36
3.2. Caracterización genética de las poblaciones	37
3.2.1. Diversidad genética de las poblaciones	37
3.2.2. Análisis estructura genética poblacional de las especies	43
3.3. Correspondencia entre quiebres genéticos asociados a quiebres biogeográficos	49
3.4. Inferencia demográfica	57

<b>4. DISCUSION</b>	<b>62</b>
4.1. Análisis Poblacionales	62
4.1.1. Caracterización Genética de las poblaciones	62
4.1.2. Caracterización Genética de las poblaciones	64
4.2. Correspondencia entre quiebres genéticos y quiebres biogeográficos	66
4.3.- Inferencia demográfica	67
<b>5. CONCLUSIÓN</b>	<b>70</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>71</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>91</b>

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 2.1.** Localidades de muestreo de *Tetrapygus niger* y *Loxechinus albus*, recolectados en el Pacífico Sudeste. 24

## 3. RESULTADOS

**Tabla 3.1.** Índices de diversidad estimados para *Loxechinus albus* por población, por Provincias Biogeográficas y en Total. 37

**Tabla 3.2.** Índices de diversidad estimados para *Tetrapygus niger* por población por Provincias Biogeográficas y en Total. 40

**Tabla 3.3.** Valores estimados de  $F_{st}$  y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) por poblaciones obtenidos a partir de la frecuencia haplotípica para *Loxechinus albus* (número de permutaciones: 5000) 44

**Tabla 3.4.** Valores estimados de  $\Theta_{st}$  y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) por poblaciones obtenidos a partir del pairwise difference para *Loxechinus albus* (número de permutaciones: 5000) 45

**Tabla 3.5.** Valores estimados de  $F_{st}$  y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) por poblaciones obtenidos a partir de la frecuencia haplotípica para *Tetrapygus niger* (número de permutaciones: 5000) 46

**Tabla 3.6.** Valores estimados de  $\Theta_{st}$  y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) por poblaciones obtenidos a partir del pairwise difference para *Tetrapygus niger* (número de permutaciones: 5000) 47

<b>Tabla 3.7.</b> Valores estimados de $F_{st}$ y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) por provincias biogeográficas obtenidos a partir de las frecuencias haplotípicas para <i>Loxechinus albus</i> (número de permutaciones: 5000)	50
<b>Tabla 3.8.</b> Valores estimados de $F_{st}$ y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) por provincias biogeográficas obtenidos a partir de las frecuencias haplotípicas para <i>Tetrapygnus niger</i> (número de permutaciones: 5000)	50
<b>Tabla 3.9.</b> Estimación de índices de fijación obtenidos a través de un AMOVA para <i>Loxechinus albus</i> a lo largo del PSE	53
<b>Tabla 3.10.</b> Estimación de índices de fijación obtenidos a través de un AMOVA para <i>Tetrapygnus niger</i> a lo largo del PSE	53
<b>Tabla 3.11.</b> Distribución a posterior de los parámetros $\Theta = x \times Ne \times u$ y $M: (m/u)$ . Del múltiplo de ambos parámetros se obtuvo el número de inmigrantes por generación entre provincias biogeográficas ( $x \times Ne \times m$ ) para <i>Loxechinus albus</i>	55
<b>Tabla 3.12.</b> Distribución a posterior de los parámetros $\Theta = x \times Ne \times u$ y $M: (m/u)$ . Del múltiplo de ambos parámetros se obtuvo el número de inmigrantes por generación entre provincias biogeográficas ( $x \times Ne \times m$ ) para <i>Tetrapygnus niger</i>	56
<b>Tabla 3.13</b> Test de neutralidad para las poblaciones de <i>Loxechinus albus</i> y <i>Tetrapygnus niger</i> del Pacífico Sureste	57

**1. INTRODUCCION**

- Figura 1.1.** Extensión y altitud sobre el nivel del mar del Último Máximo Glacial (UMG) en la Provincia Magallánica. 11
- Figura 1.2.** Estructura de los echinoideos regulares 14
- Figura 1.3.** Esquema representativo de la historia de vida de un Echinoideo 15

**2. MATERIALES Y MÉTODOS**

- Figura 2.1.** Mapa de localidades de muestreo de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* provenientes del Pacífico Sudeste 23

**3. RESULTADOS**

- Figura 3.1.** Red de Haplotipos de la especie *Loxechinus albus* por poblaciones muestreadas a lo largo del Pacífico Sudeste 39
- Figura 3.2.** Red de Haplotipos de la especie *Tetrapygyus niger* por poblaciones muestreadas a lo largo del Pacífico Sudeste 42

<b>Figura 3.3.</b> Distribución de probabilidad <i>a posteriori</i> de los cluster (K) o poblaciones de <i>Loxechinus albus</i> y <i>Tetrapygnus niger</i> a lo largo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC).	48
<b>Figura 3.4.</b> Mapa de probabilidad <i>a posteriori</i> de las poblaciones y su ubicación espacial para <i>Loxechinus albus</i> y <i>Tetrapygnus niger</i>	49
<b>Figura 3.5.</b> Red de Haplotipos de las poblaciones de <i>Loxechinus albus</i> agrupadas por provincias biogeográficas (PP, PI y PM) definidas a lo largo del Pacífico Sudeste.	51
<b>Figura 3.6.</b> Red de Haplotipos de las poblaciones de <i>Tetrapygnus niger</i> agrupadas por provincias biogeográficas (PP, PI y PM) definidas a lo largo del Pacífico Sudeste.	52
<b>Figura 3.7.</b> Distribución de desajuste entre pares de secuencias de <i>Loxechinus albus</i> y <i>Tetrapygnus niger</i> del Pacífico Sudeste	58
<b>Figura 3.8.</b> Bayesian Skyride Plot mostrando cambio en el tamaño efectivo de la población de <i>Loxechinus albus</i> del PSE	60
<b>Figura 3.9.</b> Bayesian Skyride Plot mostrando cambio en el tamaño efectivo de la población de <i>Tetrapygnus niger</i> del PSE	61

## Cantidades y simbología de las unidades de medida utilizadas

Longitud	Kilometro	km, m, cm, mm, $\mu\text{m}$
Volumen	Litro	L, ml, $\mu\text{l}$
Tiempo	Minuto	min, seg, ms, $\mu\text{s}$
Masa	Gramo	kg, mg, $\mu\text{g}$ , ng g
Concentración	Molaridad	M, mM, $\mu\text{M}$
Tamaño molecular	Pares de bases	pb
Temperatura	Grados Celsius	$^{\circ}\text{C}$

## Abreviaciones estándar

Hd	Diversidad haplotípica
K	Número de haplotipos.
S	Número de sitios polimórficos
$\Pi$	Número promedio de diferencias pareadas.
$\pi$	Diversidad nucleotídica.
$F_{st}$	Índice de diferenciación en frecuencia de haplotipos entre poblaciones
$\Theta_{st}$	Índice de diferenciación entre pares de secuencias, entre poblaciones.
$F_{CT}$	Índice de diferenciación entre grupos.
$F_{sc}$	Índice de diferenciación entre poblaciones dentro de los grupos.
$F_{st}$	Índice de diferenciación entre poblaciones
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
PSE	Pacífico Sureste
SCH	Sistema de Corrientes de Humboldt.
PP	Provincia Peruviana

PI	Provincia Intermedia
PM	Provincia Magallánica
COI	Citocromo Oxidasa subunidad I.
dNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfato.
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
Taq	DNA polimerasa
ENSO	El Niño-Oscilación del Sur.
UMG	Último Máximo Glacial
BF	Bayes Factor
MCMC	Cadenas de Markov, método Monte Carlo



Soy Andrea Paz Martínez Salinas, nací el 12 de Junio de 1983 en Santiago. Estudié en el Liceo Carmela Carvajal de Prat, en donde descubrí mi vocación vinculada a las ciencias. Luego ingresé a la Universidad de Valparaíso en donde el año 2008 me titulé como Bióloga Marina. Mi especialización en invertebrados marinos se inicia durante mi formación de pregrado, lo que sentó un precedente en el desarrollo de una línea de investigación vinculada siempre a estos modelos de estudio. He realizado docencia universitaria relacionada con esta temática, de igual forma he participado en expediciones internacionales de recolección de material bentónico, como asistente en proyectos de investigación vinculados a esta materia, publicaciones científicas y congresos nacionales e internacionales. En el año 2011 comencé mis estudios de magister en la Universidad de Chile. Actualmente me desempeño como Curadora del Área de Zoología de Invertebrados del Museo Nacional de Historia Natural de Santiago.

## DEDICATORIA

*“No te rindas, aún estás a tiempo  
De alcanzar y comenzar de nuevo,  
Aceptar tus sombras,  
Enterrar tus miedos,  
Liberar el lastre,  
Retomar el vuelo.  
No te rindas que la vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destabar el tiempo,  
Correr los escombros,  
Y destapar el cielo.  
No te rindas, por favor no cedas,  
Aunque el frío queme,  
Aunque el miedo muerda,  
Aunque el sol se esconda,  
Y se calle el viento,  
Aún hay fuego en tu alma  
Aún hay vida en tus sueños”*

Mario Benedetti

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos quienes me acompañaron a través de esta experiencia, desde los diversos lugares en que la vida me ha conectado con ustedes, especialmente a mi familia, de igual manera a la otra familia que siempre ha sido incondicional: mis amigos, los de ayer, los que siguen hoy y con los que seguiré (no me queda ninguna duda) construyendo historia.

También quiero agradecer de manera formal a mi tutor Dr Elie Poulin por haberme aceptado como alumna y haberme integrado al maravilloso universo LEM. Por todas las enseñanzas y experiencias compartidas, particularmente, por su excelente calidad profesional y humana. A quienes me iniciaron en las técnicas moleculares en el laboratorio, especialmente a Angie Díaz y Claudia Maturana, y a todo el resto de mis compañeros LEM quienes siempre tuvieron siempre la mejor disposición frente a mis diversas inquietudes, a lo que en ese momento me resultaba un mundo tan desconocido.

Agradezco a la Dra Pilar Haye, Dr Sylvain Faugeron y sus colaboradores en el proyecto Fondecyt 1090670 por haberme facilitado ejemplares colectados en la costa de Chile, en este mismo sentido, agradecer a través de la Dra. Carmen Yamashiro y al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en representación de todos los colegas que me brindaron apoyo en la colecta de especímenes a través de los diferentes puntos de muestreo en las diversas sedes del IMARPE en la costa Peruana. Sin ustedes, el desarrollo de este estudio no hubiese sido posible.

De igual forma, doy gracias a los miembros de la comisión evaluadora, Dr. David Véliz (U. de Chile) y Dr. Sylvain Faugeron (PUC), por sus valiosos comentarios y aportes a la tesis.

Quisiera agradecer a la Iniciativa Milenio a través del Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de postgrado, además del apoyo a congresos y estadías internacionales.

Finalmente, quiero agradecer infinitamente el apoyo otorgado por mis colegas y amigos, Dra María Cecilia Pardo y Dr Christian Ibañez, por ser parte esencial del cierre de este proceso, por la invaluable ayuda en el análisis de los datos y discusiones de los mismos, los admiro intelectualmente y sobre todo agradezco su amistad.

Muchas gracias a todos.

## RESUMEN

Gran parte de las especies de invertebrados marinos bentónicos se caracterizan por poseer ciclos de vida complejos, que incluyen fases larvarias planctónicas, siendo la presencia de esta fase la que les confiere potencial de dispersión facilitando la conectividad entre las poblaciones. En este sentido, el paradigma de conectividad sostiene que especies que presenten un estadio de vida asociado a un alto potencial de dispersión, presentarán baja estructuración poblacional y alta conectividad. Sin embargo, se han reportado excepciones a esta predicción, debido a la influencia ejercida por diversos factores, entre ellos, los quiebres biogeográficos han sido señalados como una de las principales barreras a la dispersión.

*Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* son especies simpátricas de equinoideos que poseen ciclos de vida complejos con fases larvarias de larga duración, en el caso de *L. albus* un mes y tres meses para *T. niger*, lo que les confiere un alto poder de dispersión. Estas especies se distribuyen en la costa del Pacífico Sureste (PSE), entre el norte de Perú y el sur de Chile, área en la que se ha definido la presencia de dos quiebres biogeográficos, el primer quiebre (30°S) ha sido señalado como el resultado de procesos históricos que no persisten en la actualidad, mientras que el segundo (42°S), ha sido definido como la principal discontinuidad biogeográfica de la costa, asociado a la particular conformación geográfica y oceanográfica coincidente con el inicio de la Provincia Magallánica, la cual ha sido fuertemente influenciada por eventos históricos, tales como, el último máximo glacial.

Se colectaron ejemplares de *L. albus* y *T. niger* desde 22 localidades de la costa del PSE. Luego, se obtuvieron secuencias del gen mitocondrial COI, y a partir de los posteriores análisis realizados, el presente estudio indica que no existe coincidencia entre los dos quiebres biogeográficos descritos para el PSE y la presencia de un patrón de estructuración genética ni filogeográfica tanto para *L. albus* como para *T. niger*. Por el contrario, ambas especies se comportan, respectivamente, como una única unidad genética poblacional a lo largo de la costa del PSE, acorde a lo sostenido por el paradigma de conectividad. Ambas especies presentaron señales de expansiones demográficas recientes, las cuales se ajustarían al último período de transición glacial-interglacial, de manera concordante con lo reportado para otras especies de similares características en el PSE.

## ABSTRACT

Most of benthic marine invertebrates species are characterized for having complex life cycles that includes planktonic larval stages, which confers dispersal potential allowing connectivity between populations. Therefore, the connectivity paradigm holds that those species which present a life stage associated with a high dispersal potential, will present low population structure and high connectivity. However, there have been reports exceptions to this prediction due to the influence of different factors, such as biogeographic breaks which have been identified as one of the main barriers to dispersion.

*Loxechinus albus* and *Tetrapygyus niger* are sympatric species of echinoids, both with complex life cycles, characterized by the presence of long duration larval stage, for *L. albus* a month and for *T. niger* 3 months, which confer them a high dispersal potential. These species are distributed at the Southeast Pacific coast (SEP), from northern Peru to southern Chile. Along this geographic range are defined two biogeographic breaks. The first one (30°) has been identified as the result of historical processes that do not persist nowadays, while the second (42°) has been defined as the main biogeographic discontinuity of the coast related to a particular geographic and oceanographic conformation, which coincides with the start of the Magellanic Province, that has been strongly influenced by historical events such as the last maximum glacial.

*L. albus* and *T. niger* specimens were collected from 22 locations along the coast of the SEP. Mitochondrial COI gene sequences were obtained, and based in subsequent analyzes, the present study indicates that there is no coincidence between biogeographic breaks

described for the SEP and the presence of population genetic structure or phylogeographic pattern for *L. albus* or *T. niger*. Instead, both species behave, respectively, as a single genetic unit population along the coast of the SEP, accordingly to connectivity paradigm. Both species showed signs of recent demographic expansion, which are in accordance with the last glacial-interglacial transition period in accordance with another cases reported to SEP.

# 1. INTRODUCCION

## *1.1. Estadios larvales de desarrollo*

La mayoría de los invertebrados marinos bentónicos poseen un ciclo de vida complejo caracterizado por la presencia de un estadio larvario planctónico, independiente de los distintos modos de vida que estos presenten en etapas juveniles o de adulto (Wray & Bely 1994, Smith 1997, Pechenik 1999, McEdward & Miner 2001, Gilg & Hilbish 2003, Duran et al. 2004, Maltagliati et al. 2010). De las aproximadamente 40 phyla presentes en los océanos, el 85% posee estadios larvarios en alguna etapa dentro de su historia de vida, de los cuales, entre el 55 y el 85% posee larvas la larga duración (semanas a meses en el plancton), el 5% posee larvas de corta duración (horas a días en el plancton) y el resto tiene larvas lecitotróficas (Ver revisión Pechenik, 1999). Por lo tanto, la presencia de una fase larvaria la que determina la presencia ineludible de estos organismos en el plancton (Pechenik 1999, Duran et al. 2004, Maltagliati et al. 2010). Las ventajas y desventajas asociadas a la presencia de tales estadios larvarios, que podrían incidir en su evolución, mantención o eliminación del ciclo de vida, han sido estudiadas por diversos autores (Ver revisión Pechenik 1999). Una de las principales ventajas, es que la presencia de una fase larvaria de larga duración otorgaría un alto potencial de dispersión, favoreciendo la persistencia a largo plazo de las especies, evitando los procesos locales de extinción (Pechenik 1999, McEdward & Miner 2001).

Esta hipótesis se sustentaría en el registro fósil y señala que especies con alto potencial de dispersión han persistido en el registro geológico por períodos de tiempo más extensos que aquellas que poseen bajo potencial (Jablonski 1986, Ver revisión Pechenik 1999). Por otra parte, una desventaja sería la alta probabilidad de ser dispersados hasta hábitats cuyas condiciones sean desfavorables para los organismos, lo que afectaría de manera evidente el éxito reproductivo de los progenitores (Ver Pechenik 1999). Sin embargo, esta desventaja podría ser compensada en el caso de los organismos bentónicos (en estado adulto) por medio de la metamorfosis selectiva, lo que les permitiría retrasar los procesos metamórficos hasta contar con las condiciones de hábitat idóneas para el asentamiento (Todd et al. 1998, Pechenik 1999). Diversos estudios han analizado desde un punto de vista evolutivo la persistencia de tales estadios larvarios en el ciclo de vida de invertebrados marinos, señalando que esta persistencia podría estar reflejando la dificultad de su eliminación, no así, la manifestación de una presión selectiva tendiente a su mantención dentro de la historia de vida de estos organismos (Wyar & Bely 1994, McEdward & Miner 1997, Todd et al. 1998, ver revisión Pechenik 1999).

### *1.2. Potencial de dispersión y conectividad poblacional*

La distribución espacial de los organismos marinos, ya sean de hábitos pelágicos o bentónicos, es heterogénea y ha sido representada a través de parches correspondientes a poblaciones locales, las cuales se encuentran aisladas unas de otras, o bien, conectadas a

través del flujo génico (Aulsebrook 2000, Grosberg & Cunningham 2001, Freeland 2005). Las condiciones del medio en el que se encuentran estos organismos, ofrece una gran variedad de formas de dispersión intra y entre poblaciones, en el caso de especies bentónicas la fase de dispersión primordial está vinculada con la fase larvaria (Cowen & Spognaule 2009), la que facilita su movilidad a través de su rango de distribución. (Palumbi 1996, Grosberg & Cunningham 2002, Cárdenas et al. 2009, Cowen & Spognaule 2009, Haye et al. 2014). Tales patrones de dispersión, conferidos por la presencia de estos estadios larvarios y su escala espacial, son considerados de gran importancia como factores reguladores de las dinámicas poblacionales marinas (Gilg & Hilbish 2003). Es de esta manera como la dispersión larvaria posibilita la conectividad, entendida como el grado de intercambio de organismos de una especie a través de las diversas poblaciones presentes a lo largo de su rango de distribución (Palumbi 2003, Cowen & Spounagle 2009).

En este sentido, se espera que especies que presenten al menos durante alguna etapa de su ciclo de vida un estadio asociado a un alto potencial de dispersión, muestren una baja estructuración genética entre poblaciones (Scheltema, 1971; 1986a, 1986b; Pechenik, 1999, Grosberg & Cunningham, 2001; Palumbi 2001, Ayre et al. 2009). Sin bien esta predicción ha sido avalada por numerosos estudios (Todd et al. 1998, Bohonak, 1999, Cárdenas et al. 2009, Zakas et al. 2009, Haye et al. 2010, Maltagliati et al. 2010, Dawson et al. 2011, Ibañez et al 2011, Haye et al. 2014), se han descrito casos de alta estructuración genética en especies cuyo ciclo de vida contempla estadios larvarios de larga duración e incluso en especies que pasan toda su vida formando parte del plancton

(Hereu et al. 2004, Sotka & Palumbi, 2006, Ayre et al. 2009, Pelc et al. 2009, Teske et al. 2011), contrario a lo establecido por el paradigma de conectividad, el cual señala que organismos con alto poder de dispersión suelen presentar una escasa o nula diferenciación genética (Haye et al. 2014).

Los factores que pueden incidir sobre el cumplimiento de este paradigma de conectividad pueden ser aspecto biológico (comportamiento larvario, predación, disponibilidad de alimento), oceanográfico (corrientes) y/o biogeográficos, tales que impidan la dispersión afectando la conectividad, a pesar de que las especies presenten un estadio larvario de larga duración (Awise 1992, Awise 1994, Duran et al. 2004, Waters & Roy 2004, Dawson 2005, Waters et al. 2005, Goldstein et al. 2006, Ross et al. 2009, Waters et al. 2007, Dawson et al. 2011, Lessios 2012).

Otro factor que podría incidir sobre el paradigma de conectividad es la duración de la fase larvaria planctónica ya que esta puede influenciar la conectividad de las poblaciones de invertebrados marinos bentónicos sobre amplios rangos geográficos de distribución (Todd et al. 1998, Haye et al. 2014). Escasos estudios han establecido como la variación de esta se relaciona con la escala a la cual las larvas dispersen determinando la conectividad entre las poblaciones y por ende la estructura genética, siendo aún un tema que no ha sido ampliamente desarrollado. Sin embargo, los estudios existentes sugieren que dentro de los taxa que se desarrollan a través de larvas planctotróficas, la escala geográfica de la conectividad podría estar ligada a la duración de la fase larvaria, siempre teniendo en cuenta aspectos tales como el tipo de marcador molecular, el diseño

de muestreo y los análisis genéticos tendientes a caracterizar la estructura genética de tales poblaciones (Todd et al. 1998, Bohonak 1999, Ross et al. 2009, Haye et al. 2014).

### *1.3. Conectividad y estructuración genética poblacional*

La estructura genética de una especie ha sido definida como el patrón de distribución de los alelos en un rango de geográfico siendo este el reflejo de la interacción de procesos históricos y contemporáneos, entre los cuales se conjugan la influencia ejercida por aspectos ecológicos, demográficos, conductuales, genéticos, oceanográficos, tectónicos e incluso antrópicos, sobre las poblaciones de las diferentes especies (Palumbi 1996, Ayre et al. 2000, Godson et al. 2001, Grosberg & Cunningham 2002, Freeland 2005, Gawarkiewicz et al. 2007, Haye et al. 2014). Los patrones geográficos de tal estructuración genética pueden proporcionar información útil sobre la conectividad histórica y actual entre las poblaciones de las diferentes especies (Cardenas et al. 1999, Avise, 2000, Pelc 2009, Haye et al. 2014).

En este sentido, quiebres biogeográficos pueden generar quiebres filogeográficos, es decir, discontinuidades genéticas intraespecíficas que ocurren cuando se han presentado, en el pasado o el presente, barreras a la dispersión que permiten una diferenciación genética e impiden la homogenización que provoca la conectividad, ya que al estar divididas se interrumpe el flujo génico dentro de la especie (Grosberg & Cunningham 2001, Cárdenas et al 2009, Pelc et al. 2009, Haye et al. 2014). Es de esta manera, que los quiebres biogeográficos son considerados de gran interés para el estudio de procesos

históricos y/o contemporáneos que puedan afectar la distribución y abundancia de las especies (Haye et al 2014).

Dependiendo de la capacidad de dispersión y sobrevivencia de los organismos en diferentes condiciones ambientales, los quiebres biogeográficos pueden coincidir con los límites de los rangos de distribución de las especies. En este sentido, se han observado 3 patrones: a) especies cuyo rango geográfico se encuentra dentro de esta área, b) especies que atraviesan la zona de transición, pero que su estructura y densidad poblacional cambian luego de esto y, c) especies que atraviesan esta zona pero que no presentan ninguna discontinuidad que lo refleje (Haye et al. 2014). Estudios recientes han reportado evidencia de alta estructuración asociada a quiebres biogeográficos, los cuales contribuyen en la inferencia del origen y/o persistencia de la estructuración biogeográfica en tales especies (Dawson 2001, Kuo & Avise 2005, Goldstein et al. 2006).

Se han realizado estudios filogeográficos (interpretación de la distribución espacial de los linajes de genes) utilizando marcadores moleculares y en especial regiones del ADN mitocondrial (ADNmt) por la utilidad de este marcador para determinar la estructura genética de las poblaciones (Duran et al. 2004). El marcador COI ha demostrado ser altamente polimórfico en varias especies de equinoideos (Palumbi et al. 1997, Lessios et al. 1999, Debenham et al. 2000, McCartney et al. 2000, Lessios et al. 2001, Lessios et al. 2003, Iuri et al. 2007) permitiendo la detección de flujo génico histórico y contemporáneo (Avise et al. 1987), habiéndose reportado concordancia entre quiebres filogeográficos y biogeográficos (Collin 2001, Goldstein 2006, Ayre et al. 2009,

Cárdenas et al. 2009, Pelc et al. 2009, Haye et al. 2014) lo que tendría relación directa con los potenciales de dispersión conferidos por la presencia y duración de fases larvarias dentro de los ciclos de vida en diferentes taxa de invertebrados marinos bentónicos (Dawson 2001, Pelc et al. 2009, Haye et al. 2014).

Es así como la intensidad del quiebre filogeográfico reportado puede ser una referencia para distinguir entre los orígenes a la interrupción del flujo génico como parte de un proceso del pasado o actual (Avice 2000, Ayre et al. 2009, Haye et al. 2014).

En este sentido, patrones congruentes de estructuración filogeográfica a través de varias taxa resultan altamente informativos, ya que quiebres genéticos reportados para una o más especies pueden haberse definido por causales puntuales, en cambio, quiebres genéticos concordantes a través de múltiples especies pueden interpretarse como una barrera efectiva al flujo génico (Pelc et al. 2009, Teske et al. 2011).

#### **1.4. Área de Estudio.**

El Pacífico Sureste (PSE) ha sido definido como una extensa área que va desde la línea del ecuador hasta el sur de los 40°S, regida por un complejo sistema de corrientes marinas, definido como uno de los más productivos del mundo debido a los intensos procesos de surgencia que allí se registran (Thiel et al. 2007, Ibáñez et al. 2011, Hooker et al. 2013). El de mayor importancia es el Sistema de Corrientes de Humboldt (HCS), el cual se origina a los ~42°S como consecuencia de los vientos producidos por el giro

anticiclónico del Pacífico Sur y se desplaza recorriendo el perfil costero hasta los 6°S donde se desvía hacia el este (Thiel et al. 2007). Esta corriente desplaza un flujo hacia el norte de aguas superficiales de origen sub-antártico, además arrastra masas de agua cuyas temperaturas fluctúan entre los 13°C y 18°C, dependiendo del año, estación y posición geográfica, lo que depende en gran medida de los intensos eventos de surgencia que traen consigo aguas ricas en nutrientes acumulados en el fondo de la plataforma continental (entre los 50-100 m de profundidad) hacia la superficie en la zona próxima a la costa (Montecino et al. 2005, Thiel et al. 2007). Estas masas de agua ejercen influencia costera permitiendo el crecimiento de praderas marinas (principalmente algas pardas) las cuales sirven de alimento a organismos herbívoros, tales como algunas especies de equinoideos y gasterópodos (Hooker et al. 2013).

El Sistema de Corrientes de Humboldt (SCH) dataría desde el período Terciario y su surgimiento estaría relacionado con una serie de eventos oceanográficos a escala global que involucra la formación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), la progresiva glaciación de la Antártica (durante el Mioceno) y el inicio de la Corriente de Deriva del Oeste, los que originaron el SCH provocando el enfriamiento de la costa del PSE, ya que durante ese período la costa de Chile habría estado caracterizada por la presencia de fauna subtropical ya que las condiciones ambientales pasadas habrían sido más cálidas que las actuales (Camus 2001). Esta serie de transformaciones habrían influenciado la actual diversidad genética de las especies (Cárdenas et al. 2009, Ibáñez et al. 2011). Estas variaciones océano-atmosféricas causaron cambios en la intensidad de las surgencias y el incremento en la advección de masas de agua antárticas en el SCH,

según registros durante el Último Máximo Glacial (UMG), lo que en consecuencia habría involucrado cambios en la temperatura de la superficie del mar (SST) y en los niveles de productividad marina a lo largo de la costa del Pacífico oriental (Camus 2001, Kaiser et al. 2005, Thiel et al. 2007). Estudios realizados sobre la diversidad genética e historia demográfica en varias especies costeras del hemisferio norte, sustentan que durante los periodos de glaciación, las poblaciones habrían experimentado drásticos cambios en el rango de distribución (búsqueda de refugios en lugares libres de hielo), por causa de extinciones locales (con un fuerte cuello de botella en la diversidad genética), con el consiguiente patrón genético tipo estrella característico de una recolonización y expansión demográfica post-glaciación (Dawson et al. 2006, Marko et al. 2010). En este contexto, los cambios océano-atmosféricos asociados a los periodos de glaciación por la costa sureste del Pacífico generan un escenario idóneo para evaluar sus posibles efectos sobre la diversidad genética e historia demográfica de las poblaciones actuales.

#### 1.4.1. *Influencia de eventos históricos*

Para el PSE, Camus (2001) sugiere la siguiente clasificación biogeográfica de norte a sur: *Provincia Peruviana*, la cual se extiende entre los 4° a los 30°S, caracterizada por la presencia de biota propia de aguas templadas además del constante registro de procesos de surgencia a lo largo de todo el año, luego una zona de interfase, definida como *Área Intermedia*, donde se observan procesos de surgencia estacionales, la que da paso a la *Provincia Magallánica*, definida entre los 42° y 56°S, con presencia de biota austral y caracterizada por la presencia de fiordos, bahías, canales y estrechos, cuya formación es consecuencia de procesos tectónicos y períodos de glaciación (Cárdenas et al. 2009, Sánchez et al. 2011). Durante el último máximo glacial, la porción sur de esta provincia quedó cubierta por una extensa capa de hielo la cual se extendió hasta la plataforma continental por el oeste (Figura 1.1) (Hulton et al. 2002).

A través de la discontinuidad geomorfológica de la Provincia Magallánica (desde los 41° 30'S hacia el sur), es que se introduce un elevado aporte de agua dulce en las masas de aguas costeras, promoviendo las condiciones estuarinas: alta pluviosidad, gran amplitud mareal, baja temperatura y disminución de la salinidad (Camus 2001, Ibáñez et al. 2009). Estas condiciones hidrológicas generarían un sistema semi-aislado en los fiordos, que a la vez podría afectar la continuidad del rango de distribución de las especies en esa zona (Antezana 1999). Es aquí donde ocurre la separación de las principales corrientes oceánicas (Sistemas de Corrientes de Humboldt y Cabo de Hornos), correspondiente al límite norte de la provincia Magallánica.

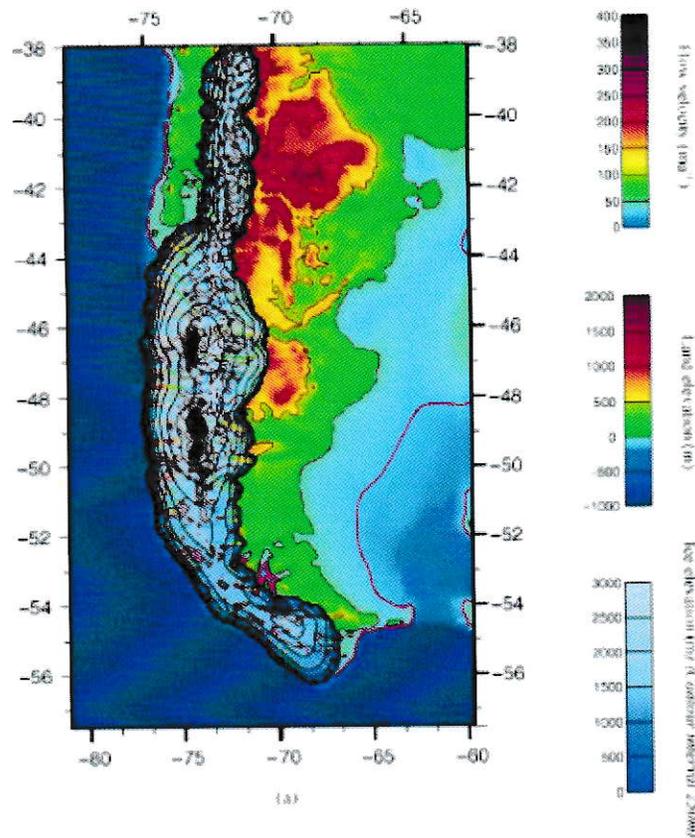


Figura 1.1. Extensión y altitud sobre el nivel del mar del Último Máximo Glacial (UMG) en la Provincia Magallánica (Adaptado de Hulton et al. 2002)

Dentro de la clasificación realizada por Camus (2001), definió dos principales quiebres biogeográficos a lo largo del PSE, entendidos estos como áreas donde coincide el límite del rango de distribución para un elevado número de especies (Sánchez et al. 2011). A nivel intraespecífico estas áreas se caracterizan por cambios en abundancia y dinámicas tanto poblacionales como de reclutamiento (e.g. Broitman et al. 2001, Rivadeneira et al. 2002). Camus (2001) describe el primer quiebre biogeográfico a los  $\sim 30^{\circ}\text{S}$ , lo cual ha sido corroborado por otros estudios (Broitman et al. 2001, Rivadeneira et al. 2002, Thiel et al. 2007, Sánchez et al. 2011). Los orígenes de esta discontinuidad marina así como

los factores ambientales que aseguran su persistencia no han sido definidos con certeza, se ha planteado podría tratarse de una disrupción actual propia del sistema costero, o bien, ser un quiebre biogeográfico resultante de un proceso vicariante o disruptivo histórico que no persiste en la actualidad (Haye et al. 2014).

El segundo quiebre biogeográfico descrito alrededor de los 42°S ha sido reconocido como la principal discontinuidad biogeográfica de la línea de costa (Camus 2001), en donde el sistema de fiordos y canales podría representar un factor clave en el establecimiento de esta disrupción (Cárdenas et al. 2009).

De los estudios filogeográficos realizados en la región del PSE, se han reportado quiebres filogeográficos coincidentes con el quiebre a los ~30°S para las siguientes especies: el alga parda *Lessonia nigrescens* (Tellier et al. 2009), el alga roja *Mazzaella laminarioides* (Montecinos et al. 2012) y el gastrópodo con desarrollo directo *Acanthina monodon* (Sánchez et al. 2011). Estos estudios evidencian una divergencia ocurrida en el pasado entre linajes al norte y al sur de los ~30°S. Por el contrario, en el caso del gastrópodo *Concholepas concholepas* (Cárdenas et al. 2009), la langosta *Pleuroncondes monodon* (Haye et al. 2010) y el cefalópodo *Dosidicus gigas* (Ibañez et al. 2011) no se evidenció estructura genética a escala macrogeográfica a través de este quiebre biogeográfico. A pesar de las diferencias en el esfuerzo de muestreo que poseen los estudios previamente señalados, en estos se evidencia la relación entre el potencial de dispersión de estas especies y la magnitud de los quiebres filogeográficos y su coincidencia con el quiebre biogeográfico de los ~30°S, ya que *L. nigrescens* y *A. monodon* poseen fases larvarias planctónicas cuya duración fluctúa entre horas a unos

pocos días, mientras que *C. concholepas*, *P. monodon* y *D. gigas* pueden pasar desde semanas hasta varios meses en la columna de agua. Por lo tanto, estos estudios sugieren que el quiebre biogeográfico de los  $\sim 30^{\circ}\text{S}$  es el resultado de una discontinuidad pasada por lo que en la actualidad no se evidencia estructuración genética a macro escala geográfica en especies con alto potencial de dispersión.

A excepción de los estudios previamente señalados, la mayoría de los que se han efectuado en la zona del PSE se han centrado en la descripción de ensamblajes de especies, no así en los mecanismos que han generado tales patrones, o bien consideran una pequeña parte de la costa del PSE (Cárdenas et al. 2009, Sánchez et al. 2011, Ibáñez et al. 2011, Haye et al. 2014). Esto se vuelve una limitante en la comprensión de los procesos, tanto históricos como contemporáneos, que han generado la distribución actual de las especies (Cárdenas et al. 2009).

### **1.5. Unidad de Estudio: Dos especies de Equinodermos de la Clase Echinoidea**

La Clase Echinoidea (Phylum: Echinodermata) incluye a los echinoideos regulares (erizos de mar) e irregulares (dólar de arena, entre otros) y está compuesta por alrededor de 950 especies descritas (Moore 2006). Los echinoideos regulares son esféricos u ovalados y el cuerpo adopta un aspecto globoso o aplanado según el eje oral-aboral. Las estructuras internas están cubiertas por un entramado de osículos que dan forma a una testa, la cual está cubierta de espinas móviles y relativamente largas emanadas de los



tubérculos, además de pedicelarios, los cuales cumplen diversas funciones (alimentación, defensa, entre otras) (Figura 1.2) (Moore 2006).

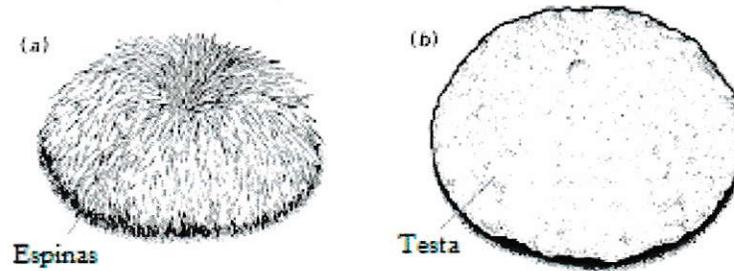


Figura 1.2. Estructura de los echinoideos regulares: a) Vista externa de un erizo de mar. b) Testa de un erizo de mar (Adaptado de Moore, 2006)

Los erizos pueden presentar una variedad de colores y medir entre 6 y 12 cm, aunque hay registros de especies del Indopacífico que alcanzan incluso los 35 cm (Ruppert & Barnes, 1996). Los erizos regulares son herbívoros y en su etapa adulta presentan escasa movilidad (Moore 2006).

El ciclo de vida de los Echinoideos es complejo y se caracteriza por la presencia de una larva conocida como *Echinopluteus* en cuyo desarrollo está implicada la formación de una serie de apéndices más o menos largos (brazos) derivados de la pared del cuerpo, cuya estructura, posición o ausencia, diferencia a los clados dentro de la Clase (Smith 1997, McEdward & Miner 2001, Moore 2006). Esta larva planctotrófica posee simetría bilateral, y la metamorfosis que experimenta es extrema, involucra reabsorción de

tejidos y el paso a la simetría pentaradial característica de los organismos en fase adulta (Figura 1.3) (Smith, 1997).

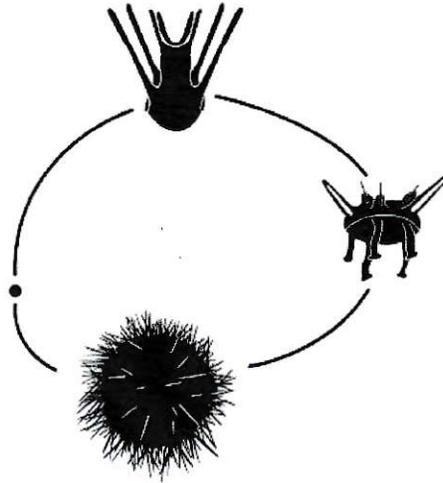


Figura 1.3. Esquema representativo de la historia de vida de un Echinoideo (Adaptado de Smith 1997)

Es en este contexto, que la presente investigación tomará como modelos de estudio dos especies de Echinoideos presentes a lo largo del PSE, con rasgos de historia de vida similares. Uno de ellos, el erizo comestible *Loxechinus albus* (Molina, 1782), es una especie de amplia distribución geográfica en el Pacífico Suroriental que se encuentra ininterrumpidamente desde el Norte de Perú, frente a la Isla Lobos de Afuera (6°LS), hasta la Isla de los Estados en el extremo austral del continente americano (57°LS) (Larraín 1975, Vásquez & Donoso 2013), describiéndose su presencia hasta los 340 m de profundidad en Chile (Arana, 2005). Numerosos estudios han sido realizados en *L. albus* acerca de aspectos reproductivos (Arrau 1958, Zamora & Stotz 1992, Arana, 2005, Gebauer & Moreno 2005, Kino & Agatsuma 2007, Schuhbauer et al. 2010), ecológicos

(González et al. 1987, Guisado & Castilla 1987), o acerca de su acuicultura y pesquería (Espejo et al. 2003, Stotz, 2003, Cárcamo et al. 2005, Moreno et al. 2006, Moreno et al. 2011), sin embargo, a excepción de algunos estudios genéticos que se han restringido a la caracterización de poblaciones puntuales dentro de su rango de distribución (Vergara et al. 2001, IFOP 2009) o el desarrollo de nuevos marcadores para secuenciación de “next generation” (Arévalo et al. 2014), y a pesar de la importancia ecológica y comercial que reviste esta especie, carece de estudios que aborden la caracterización genética y conectividad de sus poblaciones a lo largo del PSE (Arévalo et al. 2014).

*Tetrapygius niger* (Molina, 1782) conocido como erizo negro, es uno de los equinoideos más comunes presente en la costa del Pacífico Sudeste. Habita aguas someras hasta 40 m de profundidad y se distribuye desde los 6°LS hasta los 37°LS, reportándose registros aislados en el Estrecho de Magallanes (53°LS) (Zamora & Stotz, 1993). Se han realizado estudios acerca de la reproducción (Fuentes & Barros 2000) y ecología (Rodríguez & Ojeda 1993, Navarrete et al. 2008) y al igual que *L. albus* carece de estudios que caractericen genéticamente y aborden la conectividad de sus poblaciones, habiendo un único estudio que aborda tales aspectos, sin embargo, no abarca la totalidad de su rango de distribución a lo largo del PSE (Haye et al. 2014).

*Loxechinus albus* y *Tetrapygius niger* comparten un rasgo común dentro de su historia de vida, ya que ambas especies presentan estadios larvarios de larga duración, aunque con variaciones en duración entre una especie y otra. En el caso de *T. niger* se ha descrito una duración de esta fase larvaria de entre 90 a 120 días (Fuentes & Barros 2000) y ha sido definido como un alto dispersor (Haye et al. 2014) en cambio para *L.*

*albus* esta fase tendría una duración menor, estimada entre 28 y 34 días (Arrau, 1958, González et al. 1987).

De esta manera, las características biológicas y ecológicas de ambas especies de equinodermos, las vuelven en modelos de estudio apropiados para evaluar el efecto diferencial de las condiciones geográficas, oceanográficas y climáticas históricas y contemporáneas, sobre el patrón de distribución de la diversidad genética a través de su rango de distribución a lo largo del PSE. Además, se podrá evaluar si la diferencia entre la duración de los estados larvarios (1 vs. 3 meses) se refleja en la escala geográfica de la conectividad. De igual forma, los resultados permitirán evaluar la posible relación que pueda existir entre la estructuración genética y la presencia de los quiebres biogeográficos descritos para el rango de distribución de *T. niger* y *L. albus*, ya que una concordancia entre estos quiebres biogeográficos y quiebres genéticos no ha sido a la actualidad consistentemente detectado para otras especies con estadios larvarios de larga duración a lo largo la línea de costa del PSE (Cárdenas et al. 2009, Zakas et al. 2009, Haye et al. 2010, Ibáñez et al. 2011) .

## **1.6. Hipótesis unidad de estudio**

### ***1.6.1. Paradigma de conectividad de las especies***

#### **Hipótesis a**

La presencia de estadios larvarios de larga duración en los ciclos de vida de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* permitirían una alta conectividad a lo largo del rango de distribución de ambas especies

PREDICCIÓN: Ambas especies presentarán un escaso o bajo nivel de estructuración genético-poblacional.

#### **Hipótesis b**

En base a la mayor duración del estadio larvario en *Tetrapygyus niger* en comparación a *Loxechinus albus*, *T. niger* mantendría conectividad a mayor escala geográfica.

PREDICCIÓN: Se observará un modelo por distancia de estructuración genética poblacional en el caso de *L. albus* mientras *T. niger* representaría una única unidad genética.

### **1.6.2. Quiebres genéticos asociado a quiebres biogeográficos**

#### **Hipótesis a**

Dado que a lo largo del rango de distribución de *Loxechinus albus* y *Tetrapygnus niger* se han definido dos quiebres biogeográficos, y debido a la diferencia en las duraciones de las fases larvarias entre ambas especies, se espera una diferenciación en los patrones de conectividad

PREDICCIÓN: Se observará un escaso o bajo nivel de estructuración filogeográfica en ambas especies.

## **1.7. Planteamiento de objetivos**

### **1.7.1. Objetivos Generales**

1. Determinar si los patrones de diversidad genética de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* responden a un modelo de alta conectividad asociado a poblaciones de especies con fase larval planctónica de larga duración con algún tipo de diferenciación a propósito de distintas duraciones en ambos equinoideos de estas fases larvarias.
2. Evaluar si los patrones de estructuración genética y filogeográficos de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* se asocian a la presencia de los quiebres biogeográficos descritos a lo largo del rango de distribución de ambas especies.

### 1.7.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la diversidad genética de las poblaciones correspondientes a las especies *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* representadas en los sitios de muestreos distribuidos a lo largo del Pacífico Sudeste.
2. Determinar la existencia de estructuración genético poblacional de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* en el área de estudio a través del marcador molecular Citocromo Oxidasa I.
3. Determinar una posible relación entre quiebres genéticos y quiebres biogeográficos descritos a los 30° y 42°LS para ambos modelos de estudio.
4. Inferir la historia demográfica de las poblaciones de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* distribuidas a lo largo del Pacífico Sudeste mediante el marcador molecular Citocromo Oxidasa I.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Obtención de muestras

Las muestras de erizos de *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger* fueron obtenidas desde 22 localidades a lo largo de la costa del Pacífico Sureste, entre el norte del Perú ( $6^{\circ}46'S$ ,  $79^{\circ}56'W$ ) y el extremo sur de Chile ( $54^{\circ}40'S$ ,  $72^{\circ}00'W$ ), entre Septiembre de 2009 y Julio de 2012 (Tabla 2.1, Figura 2.1). Los ejemplares fueron recolectados directamente desde el intermareal o mediante buceo autónomo en zonas poco profundas. Del total de sitios muestreados 13 pertenecen a la Provincia Peruviana (PP), 7 a la Provincia Intermedia (PI) y 2 a la Provincia Magallánica (PM). Las muestras fueron preservadas en alcohol al 95% y trasladadas al laboratorio, procediendo luego a la extracción de espinas y tejido gonádico para la realización de los análisis posteriores.

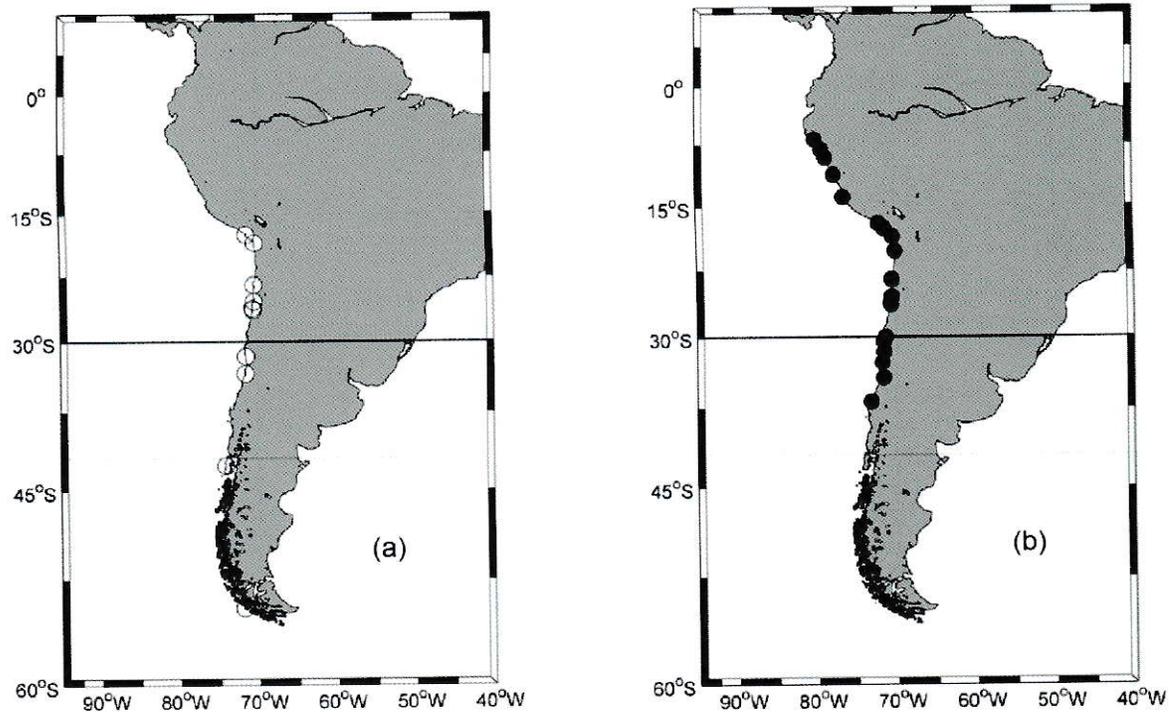


Figura 2.1. Mapa de localidades de muestreo de los erizos provenientes del Pacífico  
Sudeste a) *Loxechinus albus* b) *Tetrapygus niger*

Tabla 2.1. Localidades de muestreo de *Tetrapygyus niger* y *Loxechinus albus*, recolectados en el Pacífico Sudeste

Provincia Biogeográfica	Abreviatura	Localidad	Especie	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	Fecha Colecta	Latitud (S)	Longitud (W)
Provincia Peruviana	PP	Chiclayo	<i>Tetrapygyus niger</i>	19		23.06.2012	6° 46'	79° 56'
Provincia Peruviana	PP	Huanchaco	<i>Tetrapygyus niger</i>	12		25.06.2012	8° 04'	79° 07'
Provincia Peruviana	PP	Chimbote	<i>Tetrapygyus niger</i>	12		27.06.2012	9° 04'	78° 37'
Provincia Peruviana	PP	Huacho	<i>Tetrapygyus niger</i>	13		29.06.2012	11° 9'	77°36'
Provincia Peruviana	PP	Pisco	<i>Tetrapygyus niger</i>	18		03.07.2012	13° 52'	76° 23'
Provincia Peruviana	PP	Matarani	<i>Tetrapygyus niger</i>	15		05.07.2012	17° 01'	72° 01'
Provincia Peruviana	PP	Ilo	<i>T.niger / L. albus</i>	19	15	04.07.2012	17° 34'	71° 21'
Provincia Peruviana	PP	Arica	<i>T.niger / L. albus</i>	41	8	16.09.2009	18°32'	70°19'
Provincia Peruviana	PP	Iquique	<i>Tetrapygyus niger</i>	40		13.09.2009	20°13'	70°03'
Provincia Peruviana	PP	Antofagasta	<i>T.niger / L. albus</i>	32	17	21.01.2011	23°27'	70°30'
Provincia Peruviana	PP	Tal tal	<i>T.niger / L. albus</i>	29	23	16.01.2011	25°24'	70°30'
Provincia Peruviana	PP	Pan Azúcar	<i>T.niger / L. albus</i>	38	35	21.07.2009	26°08'	70°40'
Provincia Peruviana	PP	Chañaral	<i>T.niger / L. albus</i>	21	32	21.07.2009	26°20'	76°37'
Provincia Intermedia	PI	Coquimbo	<i>Tetrapygyus niger</i>	32		24.02.2010	29°57'	71°19'
Provincia Intermedia	PI	Fray Jorge	<i>Tetrapygyus niger</i>	32		01.12.2009	30°30'	71°35'
Provincia Intermedia	PI	Los Vilos	<i>T.niger / L. albus</i>	34	14	07.05.2009	31°37'	71°33'
Provincia Intermedia	PI	Valparaíso	<i>Tetrapygyus niger</i>	21		12.05.2010	32°47'	71°45'
Provincia Intermedia	PI	Las Cruces	<i>Loxechinus albus</i>		34	15.01.2010	33°30'	71°37'
Provincia Intermedia	PI	Pichilemu	<i>Tetrapygyus niger</i>	14		20.01.2010	34°22'	71°37'
Provincia Intermedia	PI	Concepción	<i>Tetrapygyus niger</i>	28		25.06.2010	36°48'	73°10'
Provincia Magallánica	PM	Chiloé	<i>Loxechinus albus</i>		20	25.06.2010	42°42'	74°09'
Provincia Magallánica	PM	Punta Arenas	<i>Loxechinus albus</i>		30	11.01.2012	54°40'	72°00'

### **2.1.1. Extracción de DNA, amplificación y secuenciación**

Se realizaron extracciones de ADN a partir de tejido gonadal y espinas. El ADN total fue extraído por medio del Método Salino (Aljanabi & Martínez 1997) (modificado para ser utilizado en los modelos de estudio, Anexo 1). Se verificó la calidad del ADN extraído en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó utilizando el Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

Luego, se amplificó el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) del ADN mitocondrial mediante la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction). Para esto, se diseñaron partidores específicos: un partidor directo (forward) de 25 nucleótidos ArbaF (5' TTTCTACAAACCATAAGGATATTGG'3) y un partidor inverso (reverse) de 26 nucleótidos ArbaR (5'TATACTTCAGGGTGTCCAAAGAATCA'3). Estos partidores fueron diseñados para el presente estudio en el software GENEIOUS 5.5.4 utilizando secuencias de COI de otros equinoideos obtenidas de manera referencial en GenBank.

El protocolo de PCR se estandarizó para reacciones de un volumen total de 25 µL, el que contenía 2 µL de Buffer de PCR 10X (50mM, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 2,2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5 µL de cada partidor a 10 pm/µL, 10 ng/µL de ADN, 2 µL de cada dNTP 2,5 mM, 0,5 µL Taq Platinum (Invitrogen) y 16,3 µL de agua ultra pura. Para el PCR, se usó el siguiente perfil de ciclos: denaturación inicial a 94° C (30 min.) seguida por 35 ciclos de denaturación a 94°C (40 seg.), alineamiento a 50° C (40 seg.) luego extensión a 72° C (60 seg.) seguido de un paso final de extensión a 72° C (10 min.)

El producto de PCR fue purificado en columnas de Qiagen Qiaquick y la secuenciación de este fragmento de ADN fue realizada en ambos sentidos, utilizando para ello los partidores previamente descritos. Este procedimiento fue realizado a través de los secuenciadores automáticos (ABI3730XL y ABI3700) pertenecientes a Macrogen Inc., Corea del Sur ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas en el programa Processor of Sequences, ProSeq Version 2.9 beta (Filatov 2002).

## **2.2. Análisis Datos**

### **2.2.1. Caracterización genética de las poblaciones**

#### *2.2.1.1. Índices de Diversidad de las especies*

A partir de las secuencias obtenidas para ambas especies, se calcularon los índices de diversidad estándar, tales como: Número de Haplotipos (N), Número de Sitios Polimórficos (S), Diversidad Haplotípica (H), Número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) y Diversidad Nucleotídica ( $\pi$ ). Estos índices fueron estimados para cada población, cada Provincia Biogeográfica y en total, utilizando el software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

Las reconstrucciones genealógicas a partir de datos intraespecíficos fueron representadas a través de redes de haplotipos (datos poblacionales sin recombinación) para *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger*. Las reconstrucciones se realizaron a través del algoritmo

median-joining (MJ) para datos binarios. Para ello se utilizó el Network versión 4.501 (Bandelt et al. 1999).

### **2.2.1.2. Análisis estructura genética poblacional de las especies**

Para describir la estructura genética entre localidades de *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger*, fueron estimados los índices  $F_{ST}$  (frecuencias haplotípicas) y el  $\Phi_{st}$  (número de diferencias entre pares de secuencias), análogo para datos de DNA mitocondrial (Holsinger & Weir 2009), realizado entre pares de secuencias de distintas localidades, implementado en Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2010). Las significancias estadísticas del  $F_{st}$  y  $\Phi_{st}$  se basaron en 5000 permutaciones en ambos casos, las que fueron corregidas mediante el análisis FDR (5%) (Pike 2011). Además, a través de inferencia bayesiana se estimó la probabilidad de detectar la existencia de estructuración poblacional con su respectivo patrón de organización espacial, usando datos genéticos y un modelo espacial geo-referenciado en el programa Geneland 4.0.2 (Guillot et al. 2005, Guillot 2008, Guillot & Santos 2009, Guillot et al. 2009). Este método se distingue de otros, por la capacidad de distinción del número de poblaciones (o clusters) con sus respectivos límites geográficos, asociado con una incerteza en la asignación de los individuos (datos genéticos) a estos clúster geográficos (Guillot et al. 2005). En la ejecución del análisis, la estimación del número de poblaciones (K) se realizó con cadenas de Markov-Monte Carlos (MCMC) con 10000000 de iteraciones. El primer análisis se realizó bajo un modelo de frecuencias no-correlacionadas (vector de frecuencias haplotípicas mutuamente independientes entre poblaciones) y luego otro con frecuencias correlacionadas, ambos asociados a un modelo espacial geo-referenciado.

En las iteraciones se fue muestreando cada 1000 parámetros, fijando los valores de  $K$  determinado por la moda de la distribución a posterior de la cadena de MCMC, descartando el 10% de las primeras iteraciones que no llegaron a una convergencia. Luego, mediante un Bayes Factor (BF) descrito por Raftery (1996), se eligió el modelo con mayor probabilidad *a posteriori*, y el que asignó mejor los datos genéticos de cada individuo en los clusters geográficos. Bayes Factor es definido por los valores de máxima verosimilitud marginales de los modelos ( $\text{pr}(D/M)$ ), y es expresado en:  $B10 = \frac{\text{pr}(D|MI)}{\text{pr}(D|M0)}$ ; donde  $B10$ : logaritmo base 10 de BF es la razón del valor de máxima verosimilitud marginal del modelo ( $MI$ ) con respecto al modelo ( $M0$ ), dado los datos ( $D$ ). En la escala de interpretación de BF se consideró el de  $\log B10$  donde los valores superiores a 0,5 se consideran una fuerte evidencia, valores superiores a 1 son considerados decisivos y valores inferiores a 0,5 no merecieron mención (Kass & Raftery 1995).

### 2.3. Correspondencia entre quiebres genéticos asociados a quiebres biogeográficos

Las reconstrucciones genealógicas con datos intraespecíficos (haplotipos) agrupados por provincias biogeográficas, fueron representadas a través de redes de haplotipos (datos poblacionales sin recombinación) para ambos modelos de estudio. En el caso de *Loxechinus albus* correspondió a 3 grupos: Provincia Peruviana (PP), Provincia Intermedia (PI) y Provincia Magallánica (PM) y para *Tetrapygus niger* correspondió a 2 grupos: Provincia Peruviana (PP) y Provincia Intermedia (PI). Estas reconstrucciones se realizaron a través del algoritmo median-joining (MJ) para datos binarios. Para ello se utilizó el programa Network versión 4.501 (Bandelt et al. 1999).

Para describir la estructura genética entre provincias biogeográficas de *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger*, se estimaron los índices  $F_{ST}$  (frecuencias haplotípicas) y el  $\Phi_{ST}$  (número de diferencias entre pares de secuencias), análogo para datos de DNA mitocondrial (Holsinger & Weir 2009), entre provincias biogeográficas. En el caso de *Loxechinus albus* fue comparado entre 3 grupos: Provincia Peruviana (PP), Provincia Intermedia (PI) y Provincia Magallánica (PM) y *Tetrapygus niger* 2 grupos: Provincia Peruviana (PP) y Provincia Intermedia (PI), implementado en Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005) Las significancias estadísticas del  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  se basaron en 5000 permutaciones en ambos casos.

Para testear la ocurrencia de quiebres genéticos en *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger* entre provincias biogeográficas a lo largo del Pacífico Sudeste, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA, Analysis of Molecular Variance, Dupanloup et al. 2002)

implementado en ARLEQUIN. A través de un análisis jerárquico de la variación genética se dividió la estructuración genética poblacional en tres componentes:  $F_{st}$  (estructuración genética entre todas las poblaciones de),  $F_{sc}$  (estructuración genética dentro de cada provincia biogeográfica) y  $F_{ct}$  (estructuración genética entre provincias biogeográficas), esto a partir del número de diferencias entre haplotipos por provincias biogeográficas. El nivel de significancia de los índices de fijación ( $F_{st}$ ,  $F_{sc}$  y  $F_{ct}$ ) fue estimado a partir de 10000 iteraciones para cada modelo de estudio. (Ver Excoffier et al. 1992).

Para evaluar la existencia de estructuración filogeográfica, y si este análisis se asocia a un quiebre biogeográfico, se realizó la comparación de los coeficientes de diferenciación genética entre haplotipos ordenados ( $N_{st}$ ) y no ordenados ( $G_{st}$ ) descrito por Pons & Petit (1995, 1996). La frecuencia de los haplotipos fue usada para estimar la diversidad genética promedio intra-poblacional ( $h_s$ ), la diversidad genética total ( $h_T$ ), y la proporción de la diversidad total debido a diferencia entre poblaciones ( $G_{st}$ ), junto con el número de diferencias entre los haplotipos ( $N_{st}$ , distancia entre haplotipos). El método de análisis fue el señalado por Burban et al. (1999), mediante el uso del programa PERMUT (Pons & Petit 1995, 1996). En este análisis se realizó un test con 10000 permutaciones aleatorias de  $N_{st}$  en el caso de *L. albus*, y con 1000 permutaciones en el caso de *T. niger*. Luego, los valores de  $N_{st}$  permutados fueron comparados con el valor de  $N_{st}$  observado. Si el 5% de los valores permutados fueron mayores al valor de  $N_{st}$  observado, entonces el test no es significativo, dado que no hubo diferencias significativas entre el  $G_{st}$  y el  $N_{st}$  observado. Al no encontrar diferencias significativas

entre  $N_{st}$  observado y  $G_{st}$ , entonces es considerado como un indicador de ausencia de estructuración filogeográfica.

Para determinar los patrones de migración entre poblaciones de distintas provincias biogeográficas de *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger*, se realizaron análisis de las relaciones genéticas entre grupos en base a la teoría de coalescencia. Mediante inferencia bayesiana, se estimaron las tasas de inmigración (en cada dirección) entre poblaciones de las diferentes provincias biogeográficas usando el programa Migrate-n 3.2.17 (Beerli 2011). Utilizando como priors una distribución uniforme, y el único modelo por defecto Felsenstein 84 de sustitución nucleotídica (F84). F84 es esencialmente el mismo modelo que HKY85 (estimado en este estudio con jmodel Test, Posada 2008), diferenciándose solo en el cálculo de la razón transición/transversión (Yang 2006). De este modo, se estimó la distribución de probabilidad a posteriori de los parámetros  $\Theta = x \times N_e \times \mu$ , (donde  $x$  es la ploidía y herencia de los datos, ( $N_e$ ) es el tamaño efectivo de la población, ( $\mu$ ) es la tasa de mutación por sitio por generación), y  $M = m/\mu$ . (donde ( $m$ ) es la tasa de inmigrantes dividido por  $\mu$ ); donde  $M$  es una medida de cuanto más importante es la inmigración sobre la mutación para traer nuevas variantes a la población. Del múltiplo de ambos parámetros ( $\Theta \times M$ ) se obtuvo el número de inmigrantes por generación ( $x \times N_e \times m$ , Beerli 2011). Esta aproximación hace uso de una cadena larga de Markov-Monte Carlo (MCMC), usando el algoritmo slice sampling, el cual utiliza la distribución *a posteriori* para generar un nuevo estado (este nuevo estado es compatible con los datos, por lo tanto la razón de aceptación es siempre 1,0). Las iteraciones realizadas fueron cinco réplicas, sobre la base de 50000 pasos registrados

en 100 incrementos (ciclos). Las cinco réplicas (cadenas) corridas con temperaturas estáticas distintas (1,0; 1,5; 4,0 y 5,0), permitió el intercambio entre las cadenas (dependientes de la aceptación o rechazo), experimentando magnitudes de exploración diferentes de las genealogías en el espacio (con mayores exploraciones con las cadenas más calientes). Este método, conocido como MCMCMC (Markov coupled Markov chain Monte Carlo, Geyer & Thompson 1995), permite cuatro o más cadenas con diferentes temperaturas, donde las cadenas más calientes se mueven con mayor libertad, explorando más genealogías, realizando una exploración más eficiente de los datos, estableciendo mejores intervalos de densidad, en contraste a la corrida de una única larga cadena. De este modo, se constituyó un paisaje definido por la probabilidad de 25000000 de genealogías visitadas, donde el primer 10 % de las de las genealogías fueron descartadas por no alcanzar la zona de convergencia en los valores de máxima verosimilitud en las corridas de MCMC. Con este análisis se generaron distribuciones de probabilidad de los parámetros y de las genealogías con distintos intervalos de credibilidad, representando la incerteza de los parámetros  $\Theta$  y  $M$  estimados. La robustez de las estimaciones fueron evaluadas considerando: a) Diferentes corridas de MCMC (distribuciones con una sola moda) fueron realizadas para chequear la convergencia de las cadenas, b) Los valores de autocorrelación y del tamaño efectivo de las muestras (effective sample size, ESS). Donde altos valores de autocorrelación en los algoritmos involucran frecuentes rechazos de cambios en las cadenas y menor eficiencia de búsqueda en el espacio. Menor eficiencia de búsqueda implican un insuficiente tamaño efectivo de las muestras de los parámetros ( $ESS < 500$ ), es decir de muestras

independientes, y por ende, de un análisis aún sesgado por las condiciones iniciales (priors) (Pardo-Gandarillas 2012).

#### **2.4. Inferencia demográfica**

La inferencia demográfica de las poblaciones previamente identificadas (grupos de localidades que no mostraron diferencias genéticas significativas entre ellas), se realizó en primer lugar a través de la estimación de los índices de neutralidad  $D$  de Tajima y el  $F_s$  de Fu, y sus respectivos valores de probabilidad. Estos índices detectan desviaciones del equilibrio mutación-deriva de Wright-Fisher, a través del exceso o déficit de haplotipos de baja frecuencia, originado por un crecimiento poblacional, un cuello de botella, o eventos de selección que hayan ocurrido en el pasado (Tajima 1989, Fu 1997). Ambos estadísticos y sus respectivos valores de probabilidad fueron estimados en el programa DNAsp 5.1 (Librado & Rozas 2009).

Luego se estimó la distribución de desajuste entre pares de secuencias (Mismatch Distribution) la que fue comparada con una distribución unimodal, esperada bajo el modelo de crecimiento poblacional instantáneo de Rogers y Harpending (1992) para ambos modelos de estudio en el programa DNAsp 5.1 (Librado & Rozas 2009). Luego, a partir de la distribución observada se estimó un índice de desigualdad (Raggedness index, Harpending 1994) con el propósito de determinar si esta se ajusta a la distribución unimodal esperada bajo el modelo de crecimiento instantáneo. En seguida, y solo cuando la población mostró un patrón de distribución de desajuste unimodal, se realizaron estimaciones de los

parámetros de expansión demográfica, en el software DnaSP versión 5.1 (Librado & Rozas 2009).

Finalmente, la historia demográfica de las poblaciones de ambas especies fue inferida mediante análisis de Bayesian skyride (BSR, Minin et al. 2008) en el programa BEAST version 1.7.2 (Drummond & Rambaut 2005). Este análisis no asume un modelo paramétrico de crecimiento (o decrecimiento) poblacional. Esta aproximación bayesiana utiliza Cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC), que eficientemente van muestreando en el campo aleatorio Markov Gausiano generando una distribución *a posteriori* del parámetro tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) a través del tiempo, y estimar así el tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA) en las genealogías de coalescencia. Los cambios en el tamaño efectivo entre “pequeños” y consecutivos intervalos intercoalescencia son penalizados, ya sea con ser dependiente de las longitudes de los intervalos de coalescencia (time aware) o ser independiente del tiempo (Ho & Shapiro 2011). Estas distribuciones generan intervalos de credibilidad a posteriori (95% HPD, Highest Posterior Density), representando la incerteza en el  $N_e$  y del tMRCA, (Drummond et al. 2005). Previo al análisis de Bayesian Skyride, se estimó el mejor modelo de sustitución nucleotídica bajo un criterio de decisión bayesiana (BIC), en el programa jModelTest (Posada 2008) para cada especie. Los supuestos que se asumieron para la generación de árboles de coalescencia fueron modelos de evolución molecular con reloj estricto y luego reloj relajado. La generación de árboles se realizó con un método de suavizamiento a prior “time aware”, usando una tasa de mutación de 0,6% por millón de años (ver Díaz et al. 2011). Estos análisis fueron realizados con cadenas de MCMC de 50000000 de iteraciones en el caso de *T. niger* y 20000000 de iteraciones

en el caso de *L. albus*, en ambos casos se fueron muestreando parámetros y árboles cada 1000 generaciones, descartando las primeras 500000 iteraciones en *T. niger* y 200000 iteraciones en *L. albus*. En la elección del número de iteraciones de MCMC, se consideró el número de secuencias analizadas y la complejidad del modelo usado, para así adquirir un tamaño efectivo de la muestra apropiado ( $> 200$ ). Posteriormente, mediante un Bayes Factor (BF) descrito por Newton & Raftery (1994), y con las modificaciones propuestas por Suchard et al. (2001), en el programa Tracer 1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>, Rambaut & Drummond 2009), se eligió primero la inferencia demográfica realizada con el mejor método bayesiano descrito anteriormente, y segundo con el modelo de evolución (reloj molecular estricto vs relajado) con mayor probabilidad *a posteriori* y el que representó mejor la historia demográfica de las poblaciones. El BF fue definido por los valores de máxima verosimilitud marginales de los modelos ( $\text{pr}(D/M)$ ) y expresado en:  $B10 = \frac{\text{pr}(D|MI)}{\text{pr}(D|M0)}$ ; donde  $B10$ : logaritmo base 10 de BF, es la razón del valor de máxima verosimilitud marginal del modelo ( $MI$ ) con respecto al modelo ( $M0$ ) dado los datos ( $D$ ). Para interpretar los valores de  $\log B10$  se usó una clasificación donde los valores superiores a 0,5 se consideró una fuerte evidencia, valores superiores a 1 se consideró decisivo y valores inferiores a 0,5 no merecieron mención (Kass & Raftery 1995). Finalmente, los resultados fueron visualizados y graficados en el programa Tracer versión 1.5 (Rambaut and Drummond 2009).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análisis muestras

Se obtuvieron 228 secuencias del gen mitocondrial COI (594 pb) de *Loxechinus albus*. Previo al análisis de éstas, y debido a la baja representatividad estadística de algunas localidades de muestreo y su cercanía geográfica, se procedió a la fusión de localidades en una misma población, la cual corresponde a la población 1: Ilo-Arica para *L. albus*.

Para *Tetrapygyus niger* se obtuvieron 470 secuencias del gen mitocondrial COI (546 pb). Como en el caso de *L. albus*, previo al análisis de éstas, y debido a la baja representatividad estadística de algunas localidades de muestreo y su cercanía geográfica, se procedió a la fusión de localidades en una misma población. En este caso correspondió a conformación de la población 2: Huanchaco-Chimbote y la población 5: Matarani-Ilo.

### 3.2. Caracterización genética de las poblaciones

#### 3.2.1. Diversidad genética de las poblaciones de *Loxechinus albus* y *Tetrapygnus niger*

Para *Loxechinus albus* se encontraron 28 haplotipos en los fragmentos de 594 pb del gen COI amplificado correspondiente a 228 ejemplares. Cada una de las localidades en que se realizaron los muestreos mostró una baja diversidad haplotípica, nucleotídica, entre 2 y 6 sitios polimórficos y un bajo número de diferencias entre secuencias, lo mismo se reflejó de manera global (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Índices de diversidad estimados para *Loxechinus albus* por población (N=9) y por Provincias Biogeográficas (N=3) y en total. **K**: Número de Haplotipos, **S**: Número de Sitios Polimórficos, **H**: Diversidad Haplotípica **Π**: Número promedio de diferencias entre pares de secuencias, **π**: Diversidad Nucleotídica

Población	Localidad	Provincia Biogeográfica	N	K	S	H	Π	π
	<b>NORTE</b>	<b>Provincia Peruviana</b>	<b>130</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>0,284 ± 0,053</b>	<b>0,367 ± 0,355</b>	<b>0,001 ± 0,001</b>
1	Ilo+Arica	Provincia Peruviana	23	6	6	0,395 ± 0,128	0,522 ± 0,454	0,001 ± 0,001
2	Antofagasta	Provincia Peruviana	17	2	2	0,228 ± 0,123	0,353 ± 0,362	0,001 ± 0,001
3	Tal Tal	Provincia Peruviana	23	2	2	0,170 ± 0,103	0,253 ± 0,294	0,0004 ± 0,001
4	Pan de Azucar	Provincia Peruviana	35	3	4	0,264 ± 0,094	0,333 ± 0,341	0,001 ± 0,001
5	Chañaral	Provincia Peruviana	32	4	5	0,343 ± 0,107	0,371 ± 0,364	0,001 ± 0,001
	<b>CENTRO</b>	<b>Provincia Intermedia</b>	<b>48</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>0,376 ± 0,090</b>	<b>0,540 ± 0,455</b>	<b>0,001 ± 0,001</b>
6	Los Vilos	Provincia Intermedia	14	3	3	0,396 ± 0,159	0,429 ± 0,411	0,001 ± 0,001
7	Las Cruces	Provincia Intermedia	34	8	10	0,374 ± 0,106	0,588 ± 0,484	0,001 ± 0,001
	<b>SUR</b>	<b>Provincia Magallánica</b>	<b>50</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0,469 ± 0,071</b>	<b>0,510 ± 0,439</b>	<b>0,001 ± 0,001</b>
8	Chiloé	Provincia Magallánica	20	3	3	0,600 ± 0,077	0,679 ± 0,540	0,001 ± 0,001
9	Punta Arenas	Provincia Magallánica	30	2	3	0,352 ± 0,103	0,372 ± 0,366	0,001 ± 0,001
<b>PSE</b>	<b>1 a 9</b>	<b>P.P, PI, P.M.</b>	<b>228</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>0,353 ± 0,041</b>	<b>0,450 ± 0,400</b>	<b>0,001 ± 0,001</b>

Las relaciones genealógicas obtenidas a través del Median-Joining Network, mostraron un patrón caracterizado por un haplotipo central de alta frecuencia (H1) del cual emergen haplotipos de baja frecuencia o únicos separados de este por uno o dos pasos mutacionales (Fig. 3.1). El haplotipo H1 se encontró en 183 (80,3%) de los 228 ejemplares de *L. albus*, en la totalidad de las localidades muestreadas a lo largo del rango de distribución de la especie. En términos de frecuencia, aunque muy por debajo, le siguió el haplotipo H18 presente en 13 ejemplares (5,4%), por el contrario, este haplotipo solo estuvo presente en las localidades distribuidas al sur de los 30°S. Los haplotipos restantes se diferenciaron del haplotipo dominante por uno o dos pasos mutacionales (Fig. 3.1).

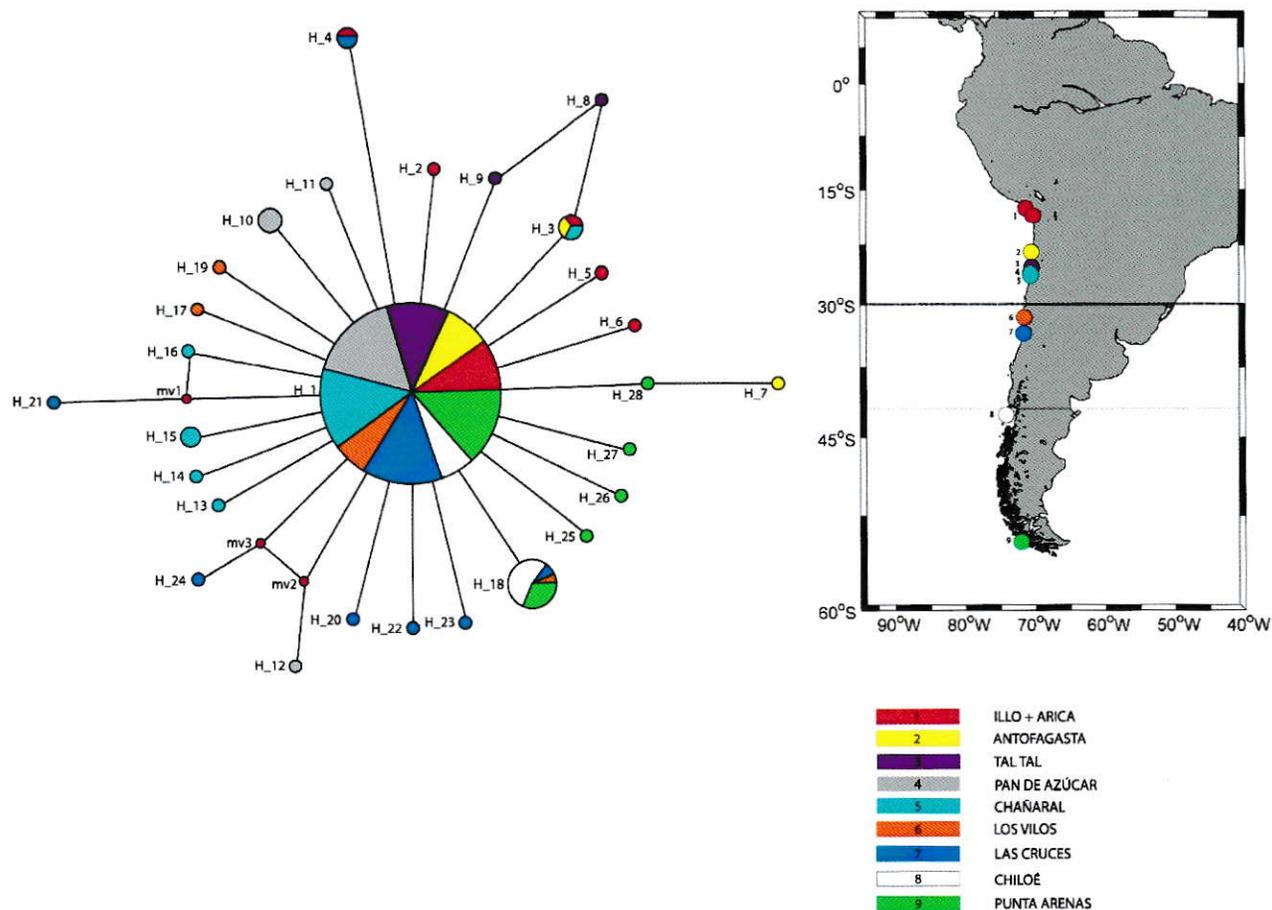


Figura 3.1. Red de Haplotipos de la especie *Loxechinus albus* por poblaciones muestreadas a lo largo del Pacífico Sudeste.

En el caso de *Tetrapygyus niger* se obtuvieron fragmentos de 546 pb en 470 ejemplares, los que correspondieron a 78 haplotipos. Cada una de las localidades en que se realizaron los muestreos mostró una alta diversidad haplotípica, nucleotídica, un total de

62 sitios polimórficos y un alto número promedio de diferencias entre secuencias (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Índices de diversidad estimados para *Tetrapygus niger* por población (N=17) y por Provincias Biogeográficas (N=2) y en total. **K**: Número de Haplotipos, **S**: Número de Sitios Polimórficos, **H**: Diversidad Haplotípica, **Π**: Número promedio de diferencias entre pares de secuencias, **π**: Diversidad Nucleotídica

Población	Localidad	Provincia Biogeográfica	N	K	S	H	Π	π
	<b>NORTE</b>	<b>Provincia Peruviana</b>	<b>309</b>	<b>64</b>	<b>56</b>	<b>0,854 ± 0,016</b>	<b>2,067 ± 1,161</b>	<b>0,004 ± 0,002</b>
1	Chiclayo	Provincia Peruviana	19	11	15	0,912 ± 0,046	2,468 ± 1,395	0,005 ± 0,003
2	Huanchaco + Chimbote	Provincia Peruviana	24	7	6	0,750 ± 0,073	1,326 ± 0,855	0,002 ± 0,002
3	Huacho	Provincia Peruviana	13	8	12	0,897 ± 0,067	2,821 ± 1,590	0,005 ± 0,003
4	Pisco	Provincia Peruviana	18	9	9	0,837 ± 0,066	1,458 ± 0,927	0,003 ± 0,002
5	Matarani + Ilo	Provincia Peruviana	34	18	24	0,927 ± 0,026	2,777 ± 1,506	0,005 ± 0,003
6	Arica	Provincia Peruviana	41	15	16	0,892 ± 0,031	2,256 ± 1,267	0,004 ± 0,003
7	Iquique	Provincia Peruviana	40	17	19	0,831 ± 0,056	2,067 ± 1,182	0,004 ± 0,002
8	Antofagasta	Provincia Peruviana	32	13	15	0,796 ± 0,068	2,002 ± 1,159	0,004 ± 0,002
9	Tal tal	Provincia Peruviana	29	12	14	0,884 ± 0,038	1,798 ± 1,069	0,003 ± 0,003
10	Pan Azúcar	Provincia Intermedia	38	12	14	0,768 ± 0,061	1,519 ± 0,933	0,003 ± 0,002
11	Chañaral	Provincia Intermedia	21	11	13	0,924 ± 0,033	2,486 ± 1,397	0,005 ± 0,003
	<b>CENTRO</b>	<b>Provincia Intermedia</b>	<b>161</b>	<b>28</b>	<b>25</b>	<b>0,797 ± 0,028</b>	<b>1,824 ± 1,055</b>	<b>0,003 ± 0,002</b>
12	Coquimbo	Provincia Intermedia	32	12	14	0,839 ± 0,054	1,897 ± 1,111	0,004 ± 0,002
13	Fray Jorge	Provincia Intermedia	32	11	13	0,859 ± 0,040	2,139 ± 1,221	0,004 ± 0,003
14	Los Vilos	Provincia Intermedia	34	12	14	0,739 ± 0,077	1,609 ± 0,978	0,003 ± 0,002
15	Valparaíso	Provincia Intermedia	21	9	12	0,800 ± 0,078	1,705 ± 1,037	0,003 ± 0,002
16	Pichilemu	Provincia Intermedia	14	7	10	0,692 ± 0,137	2,011 ± 1,204	0,004 ± 0,003
17	Concepción	Provincia Intermedia	28	9	10	0,818 ± 0,059	1,698 ± 1,024	0,003 ± 0,002
<b>PSE</b>	<b>1 a 17</b>	<b>P.P, P.I.</b>	<b>470</b>	<b>78</b>	<b>62</b>	<b>0,836 ± 0,014</b>	<b>1,983 ± 1,122</b>	<b>0,004 ± 0,002</b>

Para *Tetrapygus niger*, las relaciones genealógicas obtenidas a través del Median-Joining Network, mostraron un patrón caracterizado por la presencia de un haplotipo central dominante (H6) de alta frecuencia (36,2 %) presente en la totalidad de localidades muestreadas (Fig. 3.2), de este emergen una serie de haplotipos únicos de baja frecuencia separados por uno o dos pasos mutacionales. Separados de este haplotipo central dominante por un mayor número de pasos mutacionales se observan 5 haplotipos que le suceden en frecuencia (mayores al 5%) y presentes tanto en localidades al norte como al sur de los 30°S (H1, H4, H16, H19 y H22).

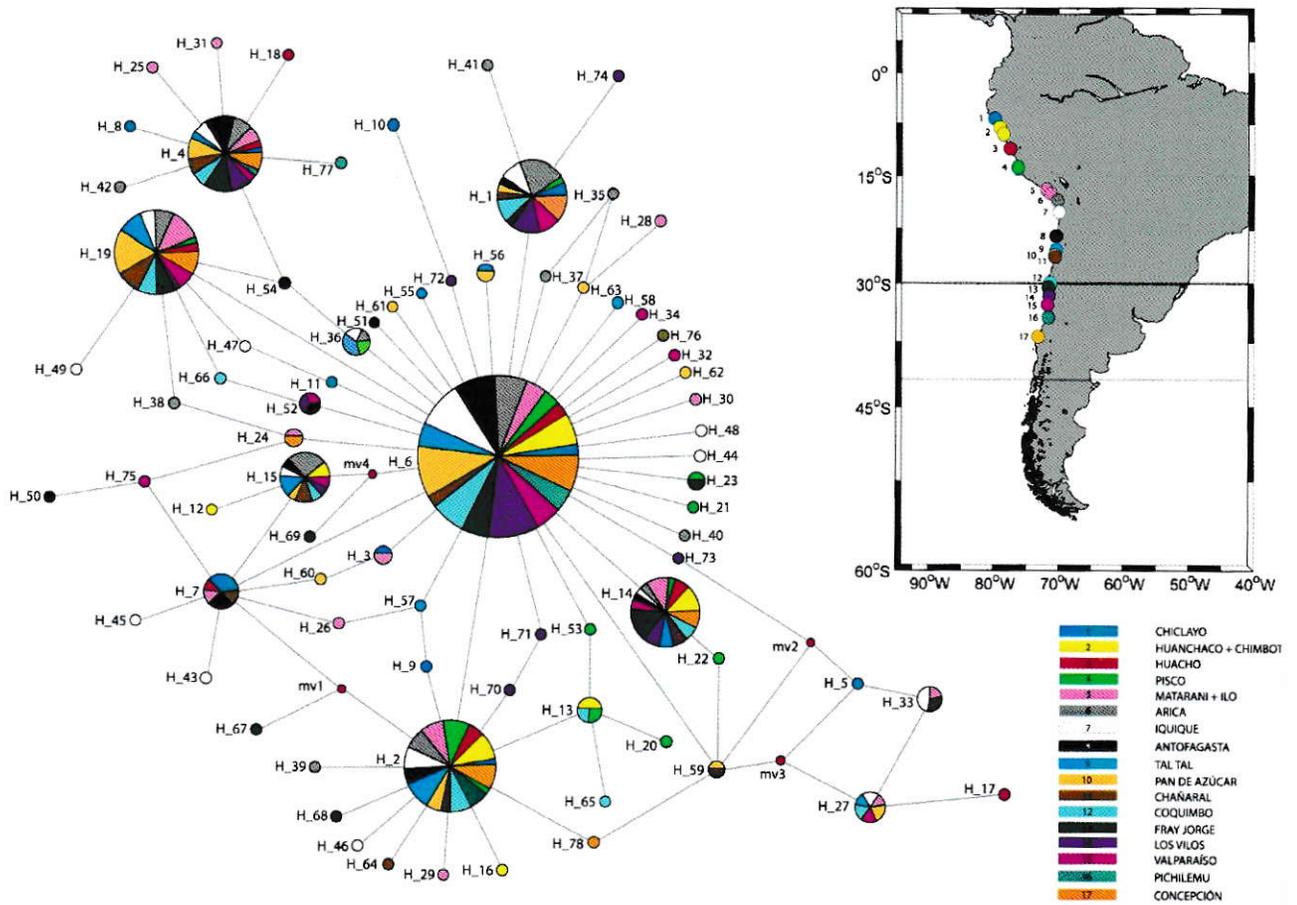


Figura 3.2. Red de Haplotipos de la especie *Tetrapygus niger* por poblaciones muestreadas a lo largo del Pacífico Sudeste.

### 3.2.2. Análisis estructura genética poblacional de las especies

Los valores de  $F_{st}$  y  $\Phi_{st}$  estimados entre pares de poblaciones muestreadas a lo largo del rango de distribución de *Loxechinus albus* y sus respectivos valores de probabilidad, mostraron valores de  $F_{st}$  y  $\Phi_{st}$  en la mayoría de los casos bajos y no significativos (Tabla 3.3 y 3.4 respectivamente). La excepción se evidenció en muy bajos niveles de estructuración pero significativos entre Chiloé y las localidades situadas al norte de ésta (Tabla 3.3). Igual situación se observó en el caso de la estimación del  $\Phi_{st}$ , en donde además de evidenciarse una baja estructuración entre Chiloé y las localidades al norte de esta, se observó un valor de estructuración muy bajo pero significativo para Punta Arenas con respecto a Pan de Azúcar (Tabla 3.4).

De igual manera, para *T. niger* se obtuvieron valores muy bajos y no significativos en la estimación de los valores de  $F_{st}$  (Tabla 3.5) y  $\Phi_{st}$  (Tabla 3.6) entre localidades muestreadas. La excepción la conformaron dos valores muy bajos pero significativos estimados para la población 2 conformada por las localidades Huanchaco y Chimbote con respecto a Pan de Azúcar, los Vilos y Valparaíso, lo que puede relacionarse con la presencia de haplotipos únicos y de baja frecuencia (Tabla 3.5)

Tabla 3.3. Valores estimados de Fst (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de significancia (p) (baja la diagonal) obtenidos a partir de la frecuencia haplotípica por poblaciones para *Loxechinus albus* (número de permutaciones: 5000; valores significativos tras corrección mediante análisis FDR en rojo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	-0,019	0,010	0,002	-0,016	-0,027	-0,020	0,129	0,002
2	0,818 ± 0,006	-	-0,022	-0,011	-0,019	-0,013	-0,012	0,187	0,009
3	0,419 ± 0,008	0,999 ± 0,000	-	-0,001	0,003	0,012	0,005	<b>0.236</b>	0,028
4	0,318 ± 0,008	0,546 ± 0,008	0,438 ± 0,007	-	0,001	-0,001	0,001	<b>0.207</b>	0,022
5	0,863 ± 0,005	0,733 ± 0,007	0,358 ± 0,007	0,307 ± 0,006	-	-0,018	-0,011	<b>0.161</b>	0,008
6	0,999 ± 0,000	0,648 ± 0,007	0,343 ± 0,007	0,381 ± 0,008	0,747 ± 0,007	-	-0,029	0,076	-0,031
7	0,999 ± 0,000	0,689 ± 0,006	0,285 ± 0,007	0,392 ± 0,007	0,678 ± 0,006	0,999 ± 0,000	-	0,130	-0,006
8	0,012 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,103 ± 0,004	0,009 ± 0,002	-	0,081
9	0,332 ± 0,006	0,336 ± 0,007	0,168 ± 0,006	0,136 ± 0,004	0,241 ± 0,006	0,769 ± 0,007	0,494 ± 0,007	0,066 ± 0,003	-

Tabla 3.4. Valores estimados de  $\Phi_{st}$  (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de significancia (p) (bajo la diagonal) obtenidos a partir del número de diferencias entre pares de secuencias por poblaciones para *Loxechinus albus* (número de permutaciones: 5000; valores significativos tras corrección mediante análisis FDR en rojo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	-0,015	0,0004	0,016	0,001	-0,003	-0,010	<b>0,157</b>	0,032
2	0,898 ± 0,004	-	-0,001	0,016	-0,005	0,001	-0,007	<b>0,171</b>	0,026
3	0,747 ± 0,006	0,591 ± 0,006	-	0,027	0,008	0,020	0,003	<b>0.205</b>	0,051
4	0,089 ± 0,005	0,205 ± 0,005	0,093 ± 0,005	-	0,020	0,019	0,009	<b>0.207</b>	<b>0,051</b>
5	0,504 ± 0,008	0,594 ± 0,007	0,321 ± 0,005	0,064 ± 0,003	-	0,008	0,002	<b>0,191</b>	0,041
6	0,717 ± 0,006	0,555 ± 0,008	0,164 ± 0,004	0,210 ± 0,006	0,322 ± 0,007	-	-0,014	0,091	-0,011
7	0,884 ± 0,005	0,820 ± 0,006	0,324 ± 0,007	0,186 ± 0,005	0,402 ± 0,007	0,832 ± 0,006	-	<b>0,128</b>	0,011
8	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,0003	0,085 ± 0,004	0,002 ± 0,001	-	0,064
9	0,049 ± 0,003	0,214 ± 0,007	0,049 ± 0,003	0,009 ± 0,001	0,024 ± 0,002	0,482 ± 0,007	0,167 ± 0,001	0,059 ± 0,003	-

Tabla 3.5. Valores estimados de Fst (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de significancia (p) (bajo la diagonal) obtenidos a partir de la frecuencia haplotípica por poblaciones para *Tetrapygus niger* (número de permutaciones: 5000)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	0,01942	-0,0254	-0,01388	-0,00029	-0,00767	-0,00229	0,00066	0,00041	0,02929	0,00187	-0,01117	0,00359	0,03311	0,01594	0,03547	-0,00591
2	0,163 ± 0,005	-	-0,01696	-0,01323	0,03451	0,02843	0,00075	0,00168	0,01026	0,02335	0,0466	-0,0056	0,00439	0,02291	0,02618	-0,00247	-0,00343
3	0,861 ± 0,005	0,597 ± 0,007	-	-0,02922	-0,02913	-0,01203	-0,01479	-0,0188	-0,02995	0,00064	-0,02763	-0,03056	-0,04007	0,01672	-0,00131	0,01667	-0,02851
4	0,646 ± 0,006	0,592 ± 0,006	0,825 ± 0,006	-	0,00296	0,00417	-0,00366	0,00848	-0,01437	0,01974	0,01226	-0,01366	-0,00503	0,04335	0,02445	0,03013	-0,01644
5	0,435 ± 0,008	0,043 ± 0,003	0,975 ± 0,002	0,342 ± 0,007	-	0,00528	0,01414	0,02328	-0,0136	0,02272	-0,02279	0,00043	-0,00781	0,05556	0,01976	0,06017	0,0016
6	0,629 ± 0,007	0,068 ± 0,003	0,656 ± 0,006	0,319 ± 0,007	0,262 ± 0,006	-	-0,00089	0,01007	-0,00351	0,01965	-0,0106	-0,01085	0,00055	0,02175	-0,00421	0,03341	-0,00755
7	0,446 ± 0,007	0,356 ± 0,006	0,705 ± 0,006	0,461 ± 0,007	0,112 ± 0,005	0,432 ± 0,007	-	-0,01213	0,0006	-0,00266	0,01493	-0,01854	0,00069	-0,00302	-0,01356	-0,00973	-0,01884
8	0,374 ± 0,007	0,359 ± 0,007	0,735 ± 0,006	0,259 ± 0,005	0,061 ± 0,003	0,175 ± 0,006	0,860 ± 0,005	-	0,01186	-0,00331	0,02358	-0,01474	-0,00057	-0,00796	-0,00631	-0,01908	-0,01255
9	0,385 ± 0,008	0,231 ± 0,006	0,924 ± 0,004	0,705 ± 0,007	0,868 ± 0,005	0,536 ± 0,007	0,378 ± 0,006	0,189 ± 0,005	-	0,00778	-0,01741	-0,0106	-0,00844	0,04419	0,0111	0,03042	-0,00864
10	0,091 ± 0,004	0,111 ± 0,004	0,372 ± 0,007	0,154 ± 0,004	0,065 ± 0,003	0,072 ± 0,004	0,477 ± 0,007	0,469 ± 0,007	0,242 ± 0,006	-	0,01833	-0,00803	0,01111	0,00798	-0,01371	-0,00102	-0,00997
11	0,393 ± 0,006	0,045 ± 0,003	0,866 ± 0,005	0,265 ± 0,006	0,988 ± 0,002	0,712 ± 0,006	0,154 ± 0,006	0,109 ± 0,004	0,841 ± 0,005	0,150 ± 0,005	-	-0,00296	-0,00954	0,05454	0,01016	0,06706	0,00284
12	0,669 ± 0,006	0,514 ± 0,007	0,928 ± 0,004	0,676 ± 0,006	0,399 ± 0,007	0,791 ± 0,005	0,991 ± 0,001	0,884 ± 0,005	0,717 ± 0,007	0,634 ± 0,007	0,474 ± 0,006	-	-0,01419	-0,00068	-0,01995	0,00197	-0,02911
13	0,344 ± 0,007	0,327 ± 0,006	0,992 ± 0,001	0,502 ± 0,007	0,655 ± 0,006	0,397 ± 0,007	0,392 ± 0,007	0,439 ± 0,007	0,641 ± 0,007	0,195 ± 0,005	0,631 ± 0,007	0,848 ± 0,005	-	0,02195	0,00582	0,02944	-0,01495
14	0,068 ± 0,003	0,115 ± 0,004	0,197 ± 0,006	0,049 ± 0,003	0,008 ± 0,001	0,069 ± 0,004	0,460 ± 0,007	0,618 ± 0,008	0,020 ± 0,002	0,219 ± 0,006	0,019 ± 0,002	0,402 ± 0,007	0,091 ± 0,004	-	-0,01927	-0,01561	-0,00135
15	0,188 ± 0,005	0,110 ± 0,005	0,428 ± 0,007	0,156 ± 0,005	0,113 ± 0,004	0,503 ± 0,007	0,790 ± 0,006	0,529 ± 0,007	0,232 ± 0,006	0,711 ± 0,007	0,296 ± 0,006	0,870 ± 0,004	0,303 ± 0,007	0,849 ± 0,005	-	0,00109	-0,02056
16	0,111 ± 0,004	0,408 ± 0,008	0,244 ± 0,006	0,166 ± 0,005	0,020 ± 0,002	0,082 ± 0,004	0,582 ± 0,006	0,740 ± 0,006	0,116 ± 0,005	0,393 ± 0,007	0,030 ± 0,002	0,354 ± 0,007	0,116 ± 0,005	0,713 ± 0,006	0,389 ± 0,007	-	0,00388
17	0,512 ± 0,008	0,446 ± 0,007	0,863 ± 0,005	0,706 ± 0,006	0,367 ± 0,006	0,644 ± 0,006	0,974 ± 0,002	0,750 ± 0,006	0,605 ± 0,007	0,657 ± 0,006	0,364 ± 0,007	0,999 ± 0,000	0,799 ± 0,006	0,436 ± 0,006	0,852 ± 0,005	0,356 ± 0,007	-

Tabla 3.6. Valores estimados de  $\Phi_{st}$  (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de significancia (p) (bajo la diagonal) obtenidos a partir del número de diferencias entre pares de secuencias por poblaciones para *Tetrapygus niger* (número de permutaciones: 5000; valores significativos tras corrección mediante análisis FDR en rojo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	0,03128	-0,02386	0,0077	-0,01204	-0,01096	-0,02009	-0,01439	-0,01323	0,00441	-0,01672	-0,01924	-0,00832	-0,00281	-0,00445	-0,02343	-0,01976
2	0,073 ± 0,004	-	0,06303	-0,02201	0,05495	0,05347	0,04362	0,06283	0,02181	<b>0,0905</b>	0,05451	0,02303	0,03575	<b>0,0791</b>	0,08773	0,07827	0,04202
3	0,736 ± 0,007	0,030 ± 0,002	-	0,03665	-0,03931	-0,00622	-0,01416	-0,02443	-0,01563	0,00076	-0,04076	-0,01506	-0,03413	0,01264	-0,00363	-0,03864	-0,01892
4	0,320 ± 0,007	0,802 ± 0,006	0,112 ± 0,004	-	0,03088	0,03582	0,02058	0,04906	0,00841	0,06159	0,03566	0,0007	0,01558	0,0538	0,06082	0,06167	0,00428
5	0,693 ± 0,007	0,007 ± 0,001	0,997 ± 0,001	0,063 ± 0,003	-	0,00392	-0,00608	-0,01266	-0,0106	-0,00698	-0,02519	-0,00937	-0,01478	0,01339	-0,00305	-0,01959	-0,01285
6	0,662 ± 0,007	0,012 ± 0,002	0,488 ± 0,007	0,047 ± 0,003	0,289 ± 0,006	-	-0,00361	-0,00986	-0,00407	-0,00003	-0,01363	-0,01145	0,00111	-0,00725	-0,01754	-0,01696	-0,00934
7	0,910 ± 0,004	0,011 ± 0,001	0,687 ± 0,007	0,105 ± 0,004	0,618 ± 0,007	0,548 ± 0,007	-	-0,00937	-0,01387	-0,0036	-0,01641	-0,01576	0,00319	-0,00368	-0,01713	-0,01276	-0,01836
8	0,672 ± 0,006	0,011 ± 0,002	0,784 ± 0,005	0,036 ± 0,003	0,805 ± 0,006	0,700 ± 0,007	0,717 ± 0,006	-	-0,01291	-0,01024	-0,0195	-0,01237	-0,00677	-0,00222	-0,01453	-0,03555	-0,00628
9	0,741 ± 0,007	0,118 ± 0,004	0,677 ± 0,007	0,255 ± 0,006	0,755 ± 0,006	0,527 ± 0,007	0,877 ± 0,005	0,775 ± 0,006	-	-0,00923	-0,01975	-0,02004	-0,01122	0,00683	-0,00373	-0,01691	-0,0169
10	0,327 ± 0,007	0,001 ± 0,0004	0,392 ± 0,007	0,016 ± 0,002	0,620 ± 0,008	0,385 ± 0,006	0,537 ± 0,007	0,671 ± 0,006	0,679 ± 0,006	-	-0,01201	-0,00686	0,00708	0,00638	-0,01019	-0,01039	-0,00525
11	0,732 ± 0,006	0,022 ± 0,002	0,957 ± 0,003	0,074 ± 0,004	0,983 ± 0,002	0,741 ± 0,007	0,820 ± 0,005	0,832 ± 0,006	0,856 ± 0,005	0,669 ± 0,007	-	-0,01877	-0,01662	0,00913	-0,01762	-0,02073	-0,0147
12	0,857 ± 0,006	0,102 ± 0,004	0,630 ± 0,008	0,406 ± 0,007	0,709 ± 0,005	0,777 ± 0,006	0,933 ± 0,003	0,788 ± 0,005	0,950 ± 0,003	0,604 ± 0,007	0,848 ± 0,005	-	-0,01402	-0,00285	-0,01352	-0,00743	-0,02616
13	0,535 ± 0,007	0,070 ± 0,004	0,921 ± 0,004	0,218 ± 0,006	0,875 ± 0,005	0,375 ± 0,006	0,314 ± 0,006	0,548 ± 0,007	0,697 ± 0,006	0,244 ± 0,006	0,761 ± 0,006	0,822 ± 0,005	-	0,0161	0,01417	-0,01161	-0,01411
14	0,419 ± 0,007	0,0002 ± 0,0002	0,284 ± 0,007	0,022 ± 0,002	0,160 ± 0,005	0,614 ± 0,007	0,545 ± 0,007	0,407 ± 0,007	0,253 ± 0,006	0,252 ± 0,007	0,246 ± 0,006	0,470 ± 0,006	0,152 ± 0,005	-	-0,02228	-0,00688	-0,00535
15	0,493 ± 0,006	0,001 ± 0,0003	0,465 ± 0,008	0,005 ± 0,001	0,472 ± 0,007	0,852 ± 0,005	0,875 ± 0,005	0,723 ± 0,008	0,538 ± 0,007	0,641 ± 0,007	0,793 ± 0,006	0,749 ± 0,006	0,196 ± 0,005	0,929 ± 0,003	-	-0,00772	-0,01267
16	0,740 ± 0,006	0,016 ± 0,002	0,843 ± 0,006	0,026 ± 0,002	0,783 ± 0,006	0,694 ± 0,006	0,666 ± 0,006	0,961 ± 0,003	0,704 ± 0,006	0,519 ± 0,007	0,718 ± 0,006	0,526 ± 0,007	0,526 ± 0,007	0,423 ± 0,007	0,511 ± 0,007	-	-0,00398
17	0,813 ± 0,005	0,029 ± 0,003	0,661 ± 0,008	0,347 ± 0,006	0,773 ± 0,006	0,672 ± 0,007	0,948 ± 0,003	0,526 ± 0,007	0,854 ± 0,006	0,511 ± 0,008	0,718 ± 0,007	0,991 ± 0,001	0,730 ± 0,007	0,519 ± 0,007	0,692 ± 0,007	0,443 ± 0,007	-



Los resultados de estructuración genética obtenidos en el programa Geneland producto de las iteraciones realizadas (MCMC) con inferencia bayesiana (con el modelo de frecuencias no-correlacionadas) elegido mediante Bayes Factor, (*Loxechinus albus*: BF=1.32; *Tetrapygyus niger* BF=1.84), evidenciaron una máxima estimación *a posteriori* con una moda de  $K = 1$  cluster geográficos para *Loxechinus albus* (Fig. 3.3a) y *Tetrapygyus niger* (Fig. 3.3b). De este modo, la mayor probabilidad *a posteriori* en la asignación de los datos genéticos de los individuos, muestra que no se evidencia una discontinuidad genética a lo largo del rango geográfico de distribución tanto para *L. albus* (Fig. 3.4a) como para *T. niger* (Fig. 3.4b).

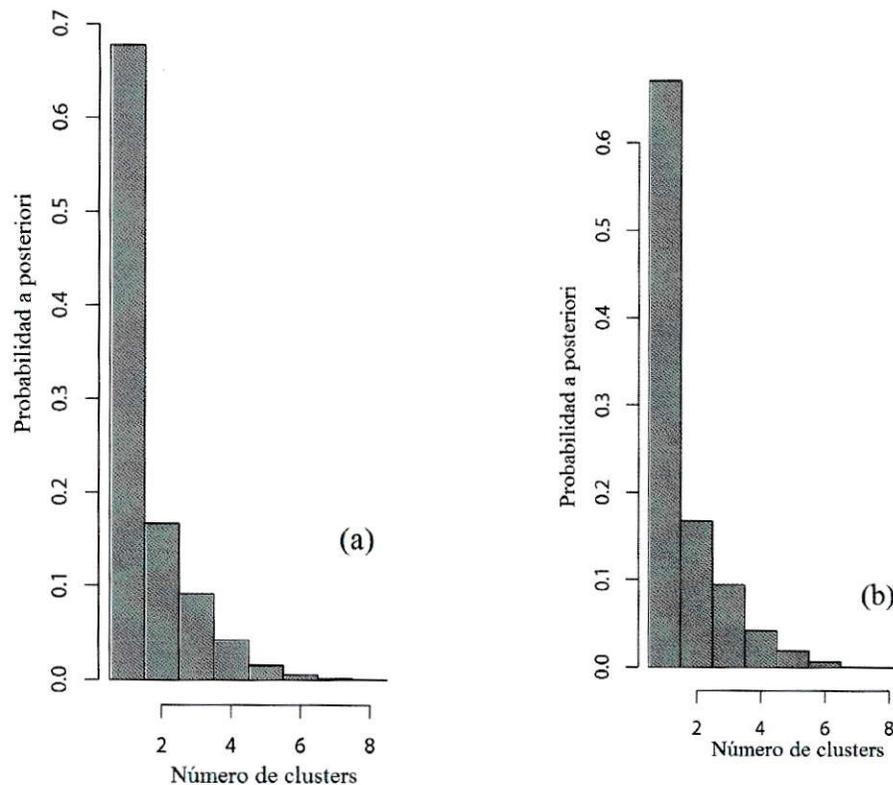


Figura 3.3. Distribución de probabilidad *a posteriori* de los cluster (K) o poblaciones de (a) *Loxechinus albus* (b) *Tetrapygyus niger* a lo largo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC).

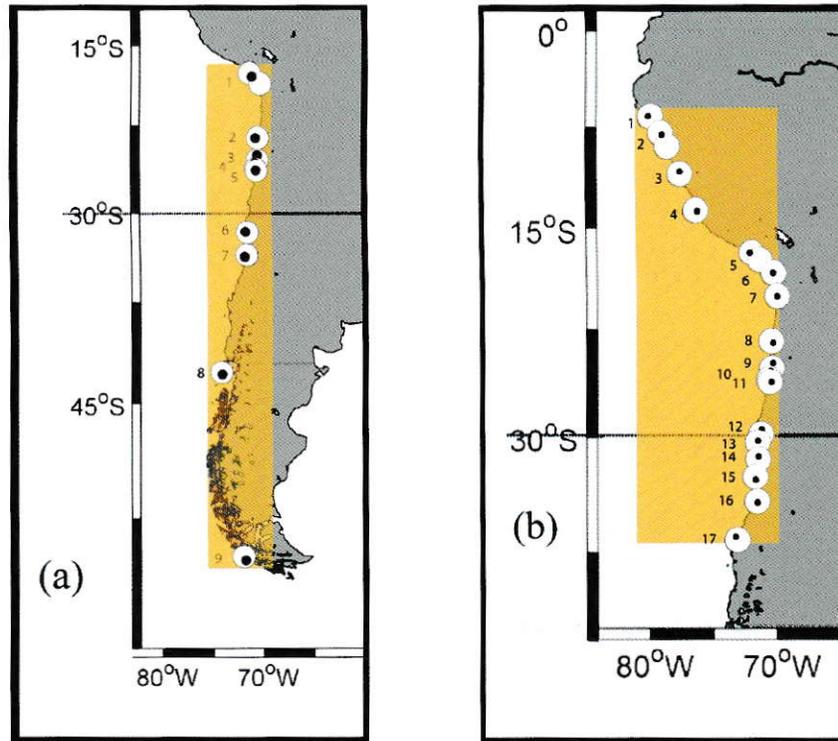


Figura 3.4. Mapa de probabilidad *a posteriori* de las poblaciones y su ubicación espacial para (a) *Loxechinus albus* (b) *Tetrpygus niger*, las cuales corresponden a una única población sin discontinuidades genéticas a través de su rango de distribución.

### 3.3. Correspondencia entre quiebres genéticos y quiebres biogeográficos

La estimación de los valores de estructuración entre provincias biogeográficas definidas a lo largo del rango de distribución para *Loxechinus albus* y *Tetrpygus niger* mostraron principalmente valores muy bajos y no significativos. La excepción la conformó *L. albus*, que entre la PP con respecto a la PM presentó un valor muy bajo de estructuración pero significativo (Tabla 3.7). En el caso de *T. niger* no se detectó estructuración entre provincias biogeográficas (Tabla 3.8).

**Tabla 3.7.** Valores estimados de  $F_{st}$  y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) obtenidos a partir de las frecuencias haplotípicas por provincias biogeográficas para *Loxechinus albus* (número de permutaciones: 10000)

	<b>PP</b>	<b>PI</b>	<b>PM</b>
<b>PP</b>	-	0,002	0,040
<b>PI</b>	0,271± 0,004	-	0,001
<b>PM</b>	0,002 ± 0,001	0,305 ± 0,004	-

**Tabla 3.8** Valores estimados de  $F_{st}$  y sus respectivos valores de significancia ( $p$ ) obtenidos a partir de las frecuencias haplotípicas por provincias biogeográficas para *Tetrapygus niger* (número de permutaciones: 10000)

	<b>PP</b>	<b>PI</b>
<b>PP</b>	-	0,003
<b>PI</b>	0,085 ± 0,002	-

Las relaciones genealógicas obtenidas a través del Median-Joining Network para *Loxechinus albus* mostraron un patrón estrellado, caracterizado por un haplotipo central (H1), de alta frecuencia y presente a lo largo de todo el rango de distribución de la especie, del cual emergen haplotipos únicos separados de este por uno o dos pasos mutacionales (Fig. 3.5). Este patrón de redes genealógicas es consistente con una población que ha sufrido una expansión demográfica reciente, atravesó por un cuello de botella o ha sufrido una selección (ver Slatkin & Hudson 1991). Los bajos valores de estructuración pero significativos mostrados por la provincia magallánica (Chiloé y Punta Arenas) con respecto a la a las otras ubicadas al norte de ésta pueden relacionarse con la presencia de un haplotipo cuya frecuencia es mayor y está principalmente representado en esta provincia (H18).

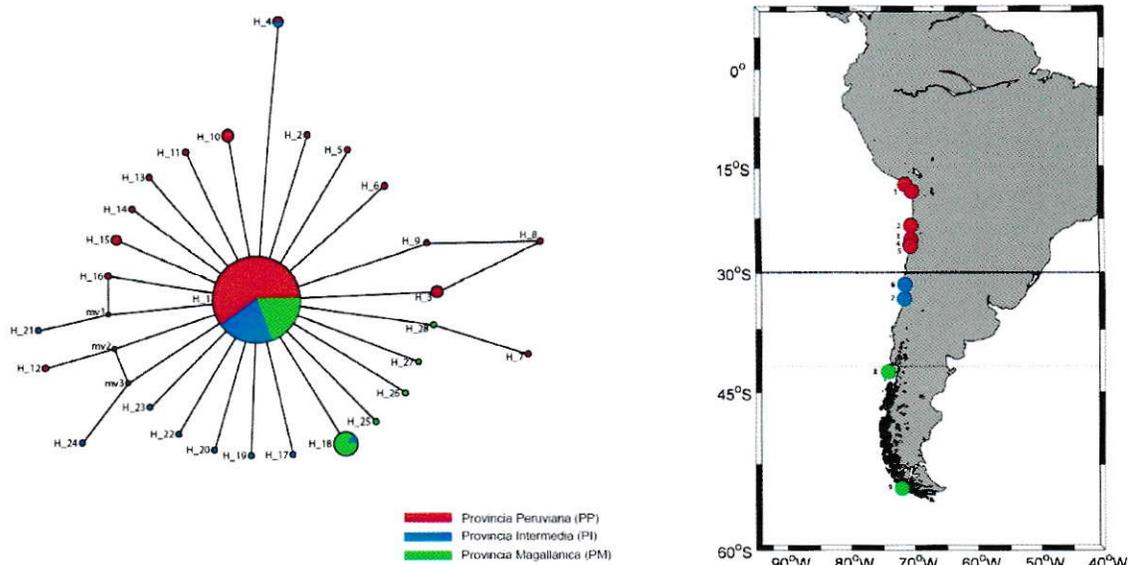


Figura 3.5. Red de Haplotipos de las poblaciones de *Loxechinus albus* agrupadas por provincias biogeográficas (PP: Provincia Peruana, PI: Provincia Intermedia y PM: Provincia Magallánicas) definidas a lo largo del Pacífico Sudeste.

De igual manera, para *Tetrapygus niger* las relaciones genealógicas obtenidas a través del Median-Joining Network mostraron un patrón estrellado, caracterizado por un haplotipo central (H6) presente tanto al norte como al sur del quiebre biogeográfico definido a los 32°S (Figura 3.6). Al igual que en el caso de *L. albus*, este patrón es consistente con una población que ha sufrido una expansión demográfica reciente, que ha atravesado por un cuello de botella o ha sufrido una selección (ver Slatkin & Hudson 1991).

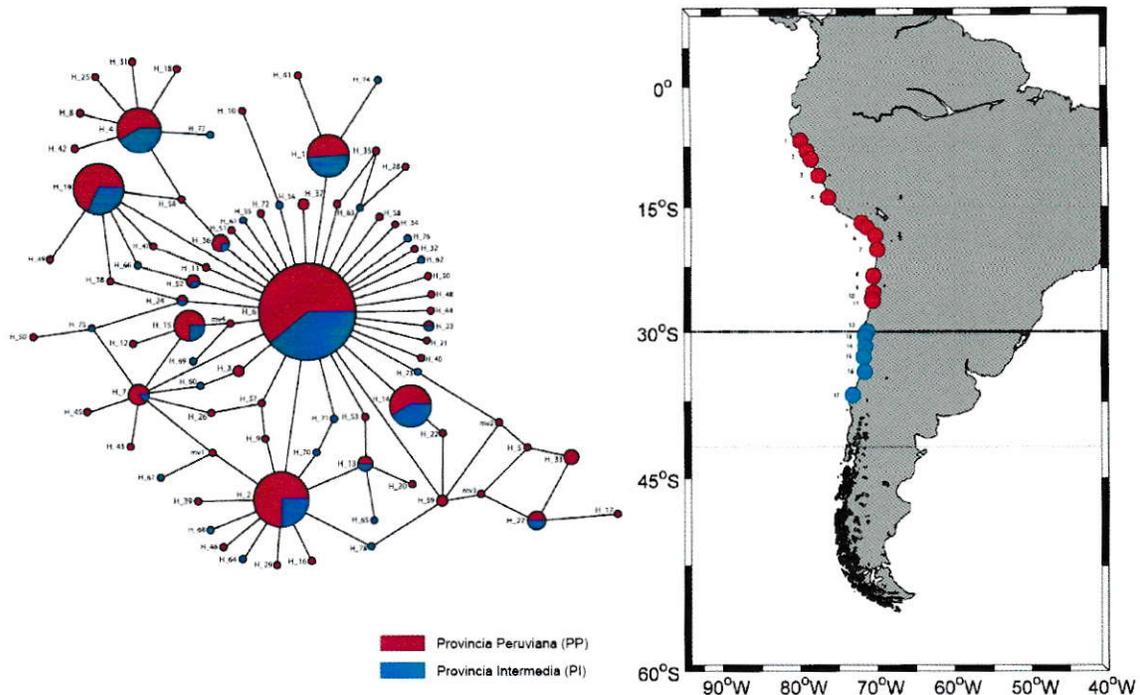


Figura 3.6. Red de Haplotipos de las poblaciones de *Tetrapygus niger* agrupadas por provincias biogeográficas (PP: Provincia Peruviana, PI: Provincia Intermedia y PM: Provincia Magallánicas) definidas a lo largo del Pacífico Sudeste.

Para testear la hipótesis de correspondencia entre quiebres genéticos coincidentes con la presencia de los quiebres biogeográficos descritos en la costa del Pacífico Sudeste, se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA) entre provincias biogeográficas para determinar los valores de  $F_{st}$ ,  $F_{sc}$  y  $F_{ct}$  con sus respectivos valores de significancia tanto para *Loxechinus albus* (Tabla 3.9) como para *Tetrapygus niger* (Tabla 3.10).

Estos análisis corroboraron la ausencia de tal correspondencia a partir de la obtención de valores de  $F_{ct}$  muy bajos y significativo solo en el caso de *L. albus* ( $F_{ct}=0.037$ ,  $P \leq 0.05$ ;

Tabla 3.9) lo que no ocurrió para *T. niger* ( $F_{ct}=0,003$   $P \geq 0,05$ ; Tabla 3.10). En ambas especies el mayor porcentaje de variación estaría dado por la varianza estimada entre poblaciones a lo largo del rango de distribución a lo largo del PSE (Tabla 3.9 y 3.10).

Tabla 3.9. Estimación de índices de fijación obtenidos a través de un AMOVA para *Loxechinus albus* a lo largo del PSE

Componentes de diferenciación	g.l.	Suma de los cuadrados	Varianza	Porcentaje de Variación	Índice de Fijación	P value
Entre provincias biogeográficas	2	1.366	0.00662	3.69	$F_{ct}=0.037$	0.018
Entre poblaciones dentro de las provincias biogeográficas	7	1.47	0.00179	1	$F_{sc}=0.010$	0.152
Entre poblaciones	218	37.248	0.17086	95.31	$F_{st}=0.047$	0.008

Tabla 3.10. Estimación de índices de fijación obtenidos a través de un AMOVA para *Tetrapygyus niger* a lo largo del PSE

Componentes de diferenciación	g.l.	Suma de los cuadrados	Varianza	Porcentaje de Variación	Índice de Fijación	P value
Entre provincias biogeográficas	1	0.762	0.001	0.34	$F_{ct}=0.003$	0.089
Entre poblaciones dentro de las provincias	15	6.424	0.0004	0.1	$F_{sc}=0.001$	0.396
Entre poblaciones	453	188.88	0.417	99.56	$F_{st}=0.004$	0.262

En cuanto a la evaluación de estructuración filogeográfica *Loxechinus albus* presentó un nivel de diversidad intra-poblacional  $h_s$  (0,347) inferior a la diversidad total  $h_T$  (0,362), indicando que la diversidad se encontró mayormente distribuida entre poblaciones  $G_{st}$  (0,043). Este análisis de estructuración filogeográfica en la variación de los haplotipos a través del rango de distribución de esta especie, mostró que el coeficiente  $N_{st}$  (0,052) fue mayor al valor de  $G_{st}$  observado (0,043). Esta diferencia, evaluada con un test de permutaciones del coeficiente  $N_{st}$ , mostró que en el percentil 95 de la distribución, el valor de  $N_{st}$  permutado (0,062) fue mayor al valor de  $N_{st}$  observado (0,052), significando que el valor de  $N_{st}$  observado se encontró fuera de la zona de rechazo (95 %) de la distribución. Por consiguiente, el  $N_{st}$  observado fue significativamente distinto y menor al valor de  $G_{st}$ , lo que sugiere la ausencia de un patrón de estructuración filogeográfico. En el caso de *Tetrapygyus niger* el nivel de diversidad intra-poblacional  $h_s$  (0,833) fue levemente inferior a la diversidad total  $h_T$  (0,835), lo que indica que la diversidad se encontró mayormente distribuida entre poblaciones  $G_{st}$  (0,003). Un análisis de estructuración filogeográfica en la variación de los haplotipos a través del rango de distribución de esta especie, mostró que el coeficiente  $N_{st}$  (-0,000) fue menor al valor de  $G_{st}$  observado (0,003). Esta diferencia, evaluada con una prueba de permutación del  $N_{st}$  observado, mostró que el valor de  $N_{st}$  permutado (0,008) en el percentil 95, fue mayor al  $N_{st}$  observado (-0,000). Esto, significó que el valor de  $N_{st}$  observado se encontró fuera de la zona de rechazo (95%) de la distribución, y fue mucho más pequeño que el 5% de los valores permutados de  $N_{st}$ . Por consiguiente, el  $N_{st}$

observado no fue significativamente distinto al valor de  $G_{st}$ , señalando la ausencia de estructuración filogeográfica.

La estimación del número de migrantes por generación en el tiempo, entre provincias biogeográficas, obtenido para *Loxechinus albus* y *Tetrapygus niger* a través de análisis bayesiano, mostró un patrón de flujo asimétrico para ambas especies, caracterizado por un mayor número de migrantes en dirección norte. En el caso de *L. albus* las poblaciones situadas al norte del quiebre biogeográfico descrito para 42°S, correspondientes a la PP y PI, mostraron una migración de 1 un ejemplar por generación hacia la PM. Por el contrario desde la PM hacia el norte el estimado fue de 15 migrantes (Tabla 3.11). Igual patrón se observó en el caso de *T. niger*, en donde se estimó un flujo de 5 migrantes desde el norte hacia la PM, mientras que desde la PM hacia el norte fue de 66 migrantes por generación en el tiempo (Tabla 3.12).

Tabla 3.11. Distribución a posterior de los parámetros  $\Theta = x \times Ne \times u$  y  $M: (m/u)$ . Del múltiplo de ambos parámetros se obtuvo el número de inmigrantes por generación ( $x \times Ne \times m$ ) para *Loxechinus albus*

Parameter	2.50%	25.00%	Mode	75.00%	97.50%	Median	Mean	
<b>Q 1</b>	0.010	0.010	0.010	0.017	0.035	0.017	0.019	
<b>Q 2</b>	0.010	0.010	0.010	0.100	0.100	0.010	0.011	<b>M*Q=N</b>
<b>PM-&gt;PI y PP</b>	0.000	0.000	0.300	1000	1000	0.300	847.400	15.89
<b>PP y PI -&gt;PM</b>	0.000	0.000	0.300	1000	1000	0.300	133.000	1.45

Tabla 3.12. Distribución a posterior de los parámetros  $\Theta = x \times Ne \times u$  y  $M: (m/u)$ . Del múltiplo de ambos parámetros se obtuvo el número de inmigrantes por generación ( $x \times Ne \times m$ ) para *Tetrapygnus niger*

Parameter	2.50%	25.00%	Mode	75.00%	97.50%	Median	Mean	
<b>Q 1</b>	0.087	0.091	0.098	0.100	0.100	0.054	0.069	
<b>Q 2</b>	0.010	0.010	0.010	0.100	0.100	0.010	0.016	<b>M*Q=N</b>
<b>PI-&gt;PP</b>	0.000	0.000	0.300	1000	1000	0.300	961.200	66.02
<b>PP-&gt;PI</b>	0.000	0.000	0.300	1000	1000	0.300	366.100	5.89

### 3.4. Inferencia demográfica

Las pruebas de Tajima (D) y Fu (Fs), para identificar si la diversidad genética se aleja del modelo neutral de equilibrio mutación-deriva, dieron como resultado valores negativos y significativos para ambas especies (Tabla 3.13) lo que indica un exceso de polimorfismos de baja frecuencia lo que sugeriría una expansión del tamaño poblacional tanto para *L.albus* como para *T. niger*.

Tabla 3.13. Test de neutralidad estimado para las poblaciones de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* del Pacífico Sureste y sus respectivos valores de significancia

<b>Especie</b>	<b>Test</b>	<b>P value</b>
<b><i>Loxechinus albus</i></b>		
Tajima (D)	-2,54401	< 0.001
Fu (Fs)	-6,05304	< 0.02
<b><i>Tetrapygyus niger</i></b>		
Tajima (D)	-2,23359	< 0.01
Fu (Fs)	-5,92216	< 0.02

La demografía histórica de las especies, a través de la distribución de desajuste entre pares de secuencias (Mismatch Distribution) mostró distribuciones unimodales en ambas poblaciones. *L. albus* mostró una distribución unimodal tipo L como consecuencia del gran número de ejemplares que comparten el mismo haplotipo central H1 (Figura 3.7a). *T. niger* mostró una distribución unimodal en la que se observan ligeras desviaciones

con respecto a la distribución esperada lo que podría ser reflejo, contrario al caso de *L. albus*, de la presencia de más de un haplotipo de alta frecuencia compartido (Figura 3.7b).

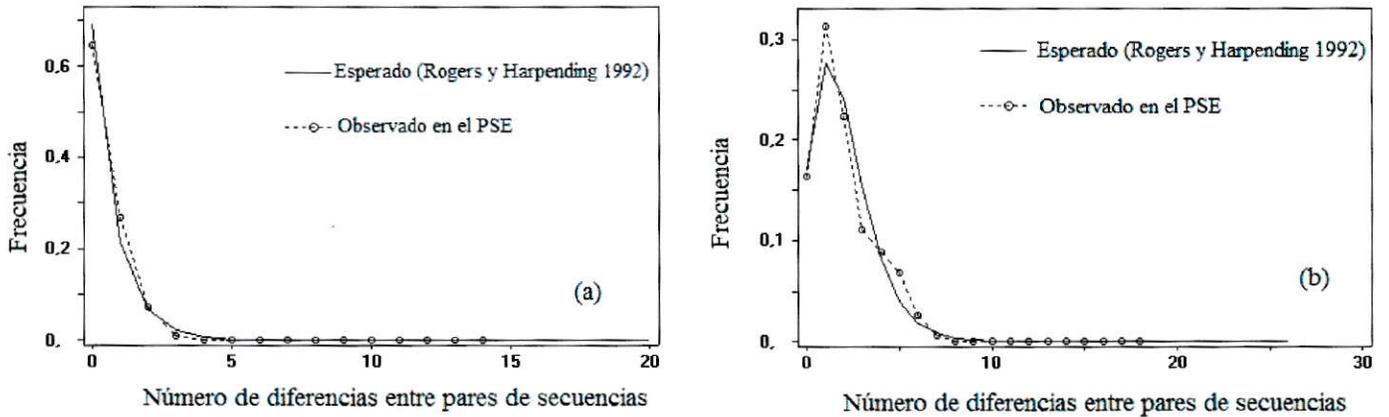


Figura 3.7. Distribución de desajuste entre pares de secuencias de (a) *Loxechinus albus* y (b) *Tetrapygnus niger* del PSE

Ambas distribuciones también pueden ser interpretadas como señales de recientes expansiones demográficas en las poblaciones, no se diferenciaron significativamente del modelo esperado de distribución unimodal *L. albus* ( $r=0,090$ ;  $p<0,000$ ) y *T. niger* ( $r=0,089$ ;  $p<0,000$ ). A partir del modelo de crecimiento y los parámetros obtenidos para *L. albus* (Tau = 2ut: 0,326) y *T. niger* (Tau = 2ut: 1,194), según el modelo de crecimiento instantáneo y basado en una tasa mutacional de 0,6% por millón de años, se

estimaron los eventos de expansión instantánea para ambas poblaciones. Se sugiere que para *L. albus* esto habría ocurrido hace 45.722 años aproximadamente, en cambio, para *T. niger* hace 182.290 años aproximadamente.

La inferencia demográfica realizada mediante análisis bayesianos de Skyride para efectuar inferencias demográficas en las genealogías de las poblaciones tanto de *Loxechinus albus* (elegido con BF= 3.1), como de *Tetrapygus niger* (elegido con BF= 1.5) del Pacífico Sudeste fueron realizados bajo el modelo de evolución con reloj molecular relajado Log Exponencial, y el mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY, en el caso de *L. albus*:  $-\ln L = 1048.30$ , BIC = 5021.80 (Figura 3.8) y *T. niger*:  $-\ln L = 1373.19$ , BIC = 8689.76 (Figura 3.9). En ambos casos los análisis efectuados bajo los supuestos de coalescencia y sin un modelo demográfico paramétrico pre-especificado, señalan nuevamente expansiones demográficas en las poblaciones del PSE para *L. albus* y *T. niger*. En el caso de *L. albus* esta expansión habría comenzado hace aproximadamente 93.000 años atrás con un ancestro común más reciente (MRCAt) estimado hace 118.000 (HPD 95% 100-200) años aproximadamente (Figura 3.8).

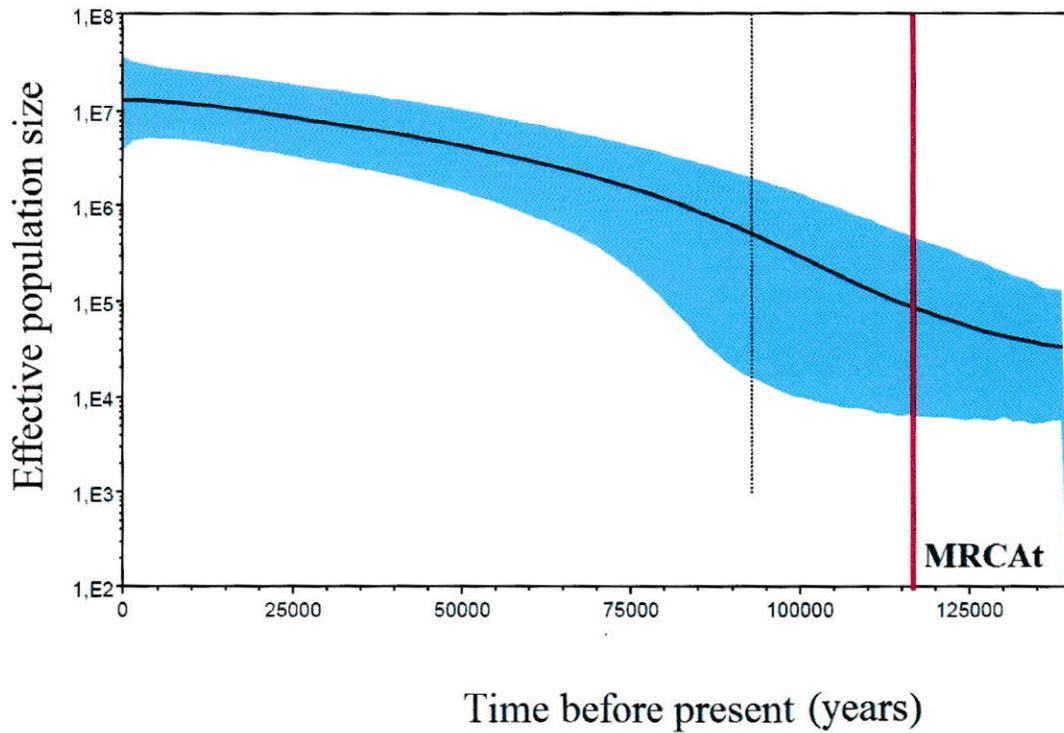


Figura 3.8. Bayesian Skyride Plot mostrando cambio en el tamaño efectivo de la población *Loxechinus albus* del PSE

Para *Tetrapygus niger* esta expansión habría comenzado hace aproximadamente 127.000 años atrás con un ancestro común más reciente (MRCA<sub>t</sub>) estimado hace 105.000 años aproximadamente (HPD 95% 123-123) (Figura 3.9)

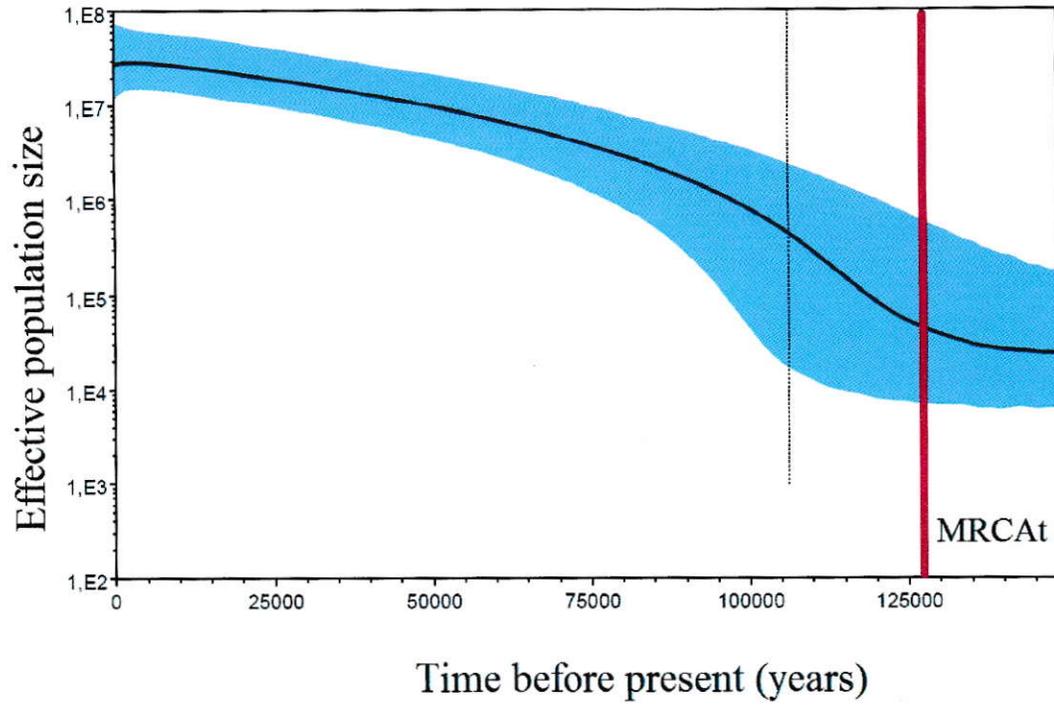


Figura 3.9. Bayesian Skyride Plot mostrando cambio en el tamaño efectivo de la población de *Tetrapygus niger* del PSE

## 4. DISCUSION

### 4.1. Análisis Poblacionales

#### 4.1.1. Caracterización Genética de las poblaciones: Diversidad genética de las poblaciones de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger*.

Al caracterizar la diversidad genética poblacional de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger*, se observó una menor diversidad genética total para *L. albus* ( $H= 0,353 \pm 0,041$ ) en comparación a *T. niger* ( $H=0,836 \pm 0,014$ ). Una forma de perder diversidad genética, a nivel de marcadores neutrales, es por la acción de la deriva genética, la cual ejercerá su fuerza de manera inversamente proporcional al tamaño de la población, por lo que grandes poblaciones debiesen mantener altos valores de diversidad genética ya que la acción de la deriva es baja y la tasa de acumulación de mutaciones es alta (Kyle & Boulding 2000, Lee & Boulding 2009, Ibañez et al. 2011, Haye et al. 2014), como es el caso de *T. niger*. En cambio para *L. albus* la menor diversidad podría deberse a posibles fluctuaciones históricas en el tamaño poblacional.

En este sentido, el alto índice de diversidad genética poblacional estimado para *T. niger* coincide con lo reportado para especies con alta capacidad de dispersión conferida por la presencia de estadios larvarios de larga duración dentro del Pacífico Sudeste (Cárdenas et al. 2009, Haye et al. 2014), así como para equinoideos de otras latitudes (ver Duran et al. 2004)

La inferencia de las relaciones genealógicas en ambas especies dieron como resultado patrones estrellados, en el caso de *L. albus* caracterizado por un haplotipo central de alta frecuencia y presente a lo largo de todo el rango de distribución de la especie, del cual emergen haplotipos únicos separados de este por uno o más pasos mutacionales. Similar situación se observa en *T. niger*, con la diferencia de que en esta especie se observa la presencia de más de un haplotipo compartido de alta frecuencia, lo que podría ser el reflejo de procesos de fijación de alelos raros a partir de tamaños poblacionales más estables. Pese a esto ambas especies se ajustan a un patrón de redes genealógicas consistente con poblaciones que han sufrido una expansión demográfica reciente (ver Slatkin & Hudson 1991), situación concordante con lo apreciado en otras especies de invertebrados marinos de similares características distribuidos en el PSE (Cárdenas et al. 2009, Ibáñez et al. 2011, Haye et al. 2014).

La presencia de un gran número de haplotipos raros de baja frecuencia presentes tanto para *L. albus* como para *T. niger*, puede tener su origen, en poblaciones caracterizadas por grandes tamaños poblacionales que a través de procesos de crecimiento o expansión, fijan un gran número de haplotipos raros (ver Duran et al. 2004).

#### **4.1.2. Caracterización Genética de las poblaciones: Estructuración genética poblacional**

No se detectó estructuración genética entre poblaciones ni entre provincias biogeográficas para *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* a través de la estimación de los índices de estructuración  $F_{st}$ . A pesar de que se registraron valores de estructuración genética estadísticamente significativos entre poblaciones y entre provincias geográficas para *L. albus* y *T. niger* estos valores fueron muy bajos y pueden deberse a la mayor frecuencia alcanzada por un haplotipo presente en todas las poblaciones a lo largo del rango. Esto se observó para los bajos niveles de estructuración pero significativos estadísticamente evidenciados para Chiloé con respecto a las poblaciones al norte de esta localidad, lo que se atribuiría a la presencia del H18 que alcanzó una mayor frecuencia con respecto al resto. En este sentido, esta diferenciación podría deberse a las características contrastes de la PM con respecto a las otras provincias en las que se distribuye *L. albus*, ya que es en esta provincia donde se genera un importante quiebre en la topografía costera la cual pierde su linealidad y da paso a un desmembramiento (al sur de los 40° S). Esta compleja topografía genera diferentes patrones de circulación en distintas escalas espaciales y temporales en los que se han identificados zonas de retención, sumado a esto las condiciones hidrológicas generarían un sistema semi-aislado en los fiordos (ver Arévalo 2014).

Por otro lado, a través de los análisis de inferencia bayesiana se obtuvo en ambos casos máximas estimaciones *a posteriori* de una única población en el rango de distribución de las especies. Es por ello que se puede sugerir, que tanto *Loxechinus albus* como

*Tetrapygyus niger* se comportan como una sola unidad poblacional. Este resultado es coincidente con otros estudios realizados en el área y que señalan el origen pasado de los quiebres biogeográficos descritos a los 30°S y 42°. En este sentido, indican que tales quiebres ocasionaron disrupciones a la conectividad de las especies en el pasado pero que en actualidad no tienen incidencia sobre los patrones de conectividad en especies con alto potencial de dispersión conferido por la presencia de estadios larvarios de larga duración (Cárdenas et al. 2009, Ibáñez 2011, Haye et al. 2014). De esta manera, las posibles señales genéticas de estructuración coincidentes con tales quiebres biogeográficos se manifestarían únicamente en especies con bajo potencial de dispersión, y por ende, bajo flujo génico (Tellier et al. 2009, Zakas et al. 2009, Sánchez et al. 2011, Ibáñez et al. 2011).

Estos resultados son concordantes con lo señalado por Vergara (2001) para *L. albus*. Mediante RAPDs y a partir de poblaciones locales el autor infirió la estructuración genética poblacional de la especie, señalando que *L. albus* se comporta como una sola gran unidad poblacional. En el caso de *T. niger*, Haye et al. (2014) incluyen los resultados preliminares de la presente investigación referidos a la costa de Chile, los cuales señalan la alta conectividad de las poblaciones y la ausencia de estructuración genética. Es importante destacar la relevancia del presente estudio, ya que es el primero en abordar el rango íntegro de distribución de ambas especies a lo largo del PSE.

## 4.2. Correspondencia entre quiebres genéticos y quiebres biogeográficos

Al realizar un análisis de estructuración ( $F_{st}$ ) agrupando poblaciones por provincias biogeográficas (PP, PI y MG, según corresponda) no se observaron valores significativos, a excepción del evidenciado en *L. albus* de la PP con respecto a la PM, lo cual, al igual que en el caso de la estimación de  $F_{st}$  por poblaciones, pudiese deberse a la presencia de un haplotipo de mayor frecuencia en esta provincia (H18). Este resultado se verificó con un análisis de varianza molecular (AMOVA) el cual corroboró que la mayor variabilidad estaba dada intrapoblaciones, no así entre poblaciones o provincias biogeográficas. Si bien se registró para *L. albus* un valor de  $F_{ct}$  significativo, esto podría deberse a la presencia del H18 de mayor frecuencia y perteneciente a esta provincia biogeográfica (PM).

De igual manera, los análisis de estructuración filogeográfica sugieren ausencia de un patrón de estructuración filogeográfico para las poblaciones de *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger*.

Los patrones de migración entre provincias biogeográficas fueron similares para *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger*, ya que en ambos casos indicaron un mayor número de migrantes en dirección sur a norte, lo que estaría relacionado con la dirección de flujo de corrientes, tal como ha sido documentado para el hemisferio norte. Wares (2001) describió un patrón de migración similar, en sentido de las principales corrientes que atraviesan el quiebre biogeográfico de Punta Concepción, para cuatro especies bentónicas que incluyen dentro de su ciclo de vida estadios larvarios planctónicos. De

igual manera, este patrón ha sido señalado para el norte de Chile (25°S y 28°S) para *Perumytilus purpuratus* (Briones et al. 2013) y *Mazzaella laminaroides* (Faugeron et al. 2001) y para otros invertebrados del PSE (ver Haye et al. 2014).

#### **4.3.- Inferencia demográfica**

Los resultados obtenidos para las pruebas de Tajima (D) y Fu (Fs) fueron valores negativos y significativos para *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger*, lo que podría reflejar una expansión del tamaño poblacional en ambas especies, resultado concordante con los patrones observados al realizar las inferencias genealógicas. Sumado a esto, en ambas especies la distribución de desajuste entre pares de secuencias (Mismatch Distribution) para las poblaciones, mostró distribuciones unimodales que no se diferenciaron estadísticamente de la distribución unimodal esperada, lo que de igual manera puede ser interpretado como una señal de poblaciones que han sufrido una expansión demográfica. Al estimar el tiempo de expansión poblacional a partir del modelo de Rogers & Harpending (1992) a través de la distribución de desajuste entre pares de secuencias y los parámetros emanados de este, se obtuvo que para *L. albus* esto habría ocurrido hace 45.722 años aproximadamente, en cambio, para *T. niger* hace 182.290 años aproximadamente.

Mediante inferencia bayesiana, el tiempo de estimación obtenido para estos procesos señalan que esta expansión en el caso de *L. albus* habría comenzado hace aproximadamente 93.000 años atrás con un ancestro común más reciente (MRCAt)

estimado hace 118.000 (HPD 95% 100-200) años aproximadamente, y para *T. niger* hace aproximadamente 105.000 años atrás con un ancestro común más reciente (MRCAt) estimado hace 127.000 años aproximadamente (HPD 95% 123-123).

Las diferencias observadas en la estimación del tiempo de expansión poblacional obtenidos a través de la distribución de desajuste entre pares de secuencias (Rogers & Harpending 1992) y las obtenidas mediante inferencia bayesiana, se deberían a la simplicidad del primer modelo, ya que no toma en cuenta los eventos de coalescencia después de la expansión y por lo tanto sub-estima las fechas de expansión (ver Pardo-Gandarillas 2012).

Cabe señalar que ambas estimaciones, a través del modelo de crecimiento de Rogers & Harpending (1992) y a través de inferencia bayesiana, fueron corregidos mediante el “tiempo de dependencia del tiempo molecular” (ver González-Wevar et al. 2011), incorporando una corrección de un orden de magnitud.

Luego de aplicar la corrección a tales estimaciones estas se ajustarían al último período de transición glacial-interglacial. Estos resultados corroboran de manera robusta la existencia de un proceso de expansión postglacial sincrónica de las poblaciones en ambas especies, lo que sería coincidente con lo reportado para otras especies de invertebrados marinos de similares características del PSE (Sánchez et al. 2011, Ibáñez et al. 2011). Este proceso de expansión poblacional postglacial detectado para ambas especies, podría estar relacionado con los cambios sucesivos y abruptos que ocurrieron durante el último máximo glacial y que podrían haber afectado a las poblaciones de

ambas especies. En este sentido, estudios recientes han señalado cambios en las condiciones oceanográficas del PSE durante el UMG, principalmente vinculados con fluctuaciones del ENSO y en la intensidad de los procesos de surgencia (Corrège et al. 2000, Koutavas et al. 2002, Mohtadi & Hebbeln 2004). Consecuencia de esto, la productividad primaria disminuyó, produciendo efectos en la trama trófica y por ende en las poblaciones que ahí habitaban. En este sentido, tanto *Loxechinus albus* como *Tetrapygus niger* pudieron ver afectadas sus poblaciones, sin embargo, en el caso de *L. albus*, pudiese haber sufrido un impacto más directo al tener un rango de distribución más amplio el que incluye la provincia magallánica, directamente afectada por los cambios producidos durante el UMG, experimentado fuertes reducciones poblacionales, con las consiguientes señales observadas a través del presente estudio.

Dado que la homogeneidad genética cubre una tremenda escala espacial (más de 4000 km) se podría hipotetizar que esta expansión demográfica ocurrió simultáneamente a lo largo del rango de distribución de las especies, y que tal situación dio como resultado una expansión geográfica con altos niveles de flujo génico entre localidades distantes (Cárdenas et al. 2009). Esto podría deberse a dos causas, por una parte, una disminución drástica en el pasado del tamaño poblacional de *L. albus* a lo largo de su distribución, seguida de una expansión demográfica post-glacial. Por otra parte, estas señales podrían estar reflejando un proceso de selección sobre un gen mitocondrial que aconteció en el pasado y que en ausencia de recombinación provocó la fijación de un alelo en la totalidad de la población. Para aclarar esta situación, debiese añadirse al presente estudio el análisis de un gen nuclear en ambos casos.

## 5. CONCLUSIONES

*Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger* presentaron un alto nivel de conectividad poblacional y carecen de señales de estructuración poblacional a lo largo de su amplio rango de distribución en el PSE. Esto se podría deber a la presencia de estadios larvarios de larga duración dentro de sus ciclos de vida, y que le confieren a las especies alto poder de dispersión, y por ende, alto flujo génico, lo que contribuye a la homogeneización de las poblaciones a través de amplios rangos geográficos.

A través del presente estudio se corrobora que al utilizar el mismo marcador y diseño de muestreo para especies en simpatria, como lo son *Loxechinus albus* y *Tetrapygyus niger*, la presencia de estadios larvarios dentro de los ciclos de vida de las especies así como su duración, se torna un buen predictor del nivel de conectividad que presentaran las poblaciones a lo largo de su rango de distribución.

Los antecedentes previamente expuestos indicarían la ausencia en la actualidad de los factores que mediaron la presencia de los quiebres biogeográficos descritos a los 30 y 42°S, los que ocasionaron disrupciones a la conectividad de las especies en el pasado pero actualmente no inciden en los patrones de conectividad en especies que presenten dentro de su ciclo de vida fases larvarias de larga duración, las que le confieren un alto potencial de dispersión y como consecuencia de ello, alto flujo génico el que contribuye a borrar las señales de tales quiebres sobre las poblaciones de tales características.



## 6. REFERENCIAS

- Aljanabi, S. & I. Martinez** (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22), 4692–4693.
- Antezana, T.** (1999) Hydrographic features of Magellan and Fuegian inland passages and adjacent subantarctic waters. *Scientia Marina*, 63 (1), 23-34.
- Arana, P.** (2005) Demografía y pesquería del erizo *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinidae) en la región sur-austral de Chile. *Revista Biología Tropical*, 53(3), 367-382
- Arévalo, A., Bruning, P., Sánchez, R. & L. Cárdenas** (2014) Development and characterization of EST-microsatellites for the edible sea urchin *Loxechinus albus* using next generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6(2), 433-435.
- Arrau, L.** (1958) Desarrollo del erizo comestible *Loxechinus albus* Mol. *Revista de Biología Marina*, 7, 39-61.
- Avise, J., Arnould, J., & R. Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, A. & N. Saunders** (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Avise, J.** (1992) Molecular population structure and biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation and biology. *Oikos*, 63, 62–76.

- Avise, J.** (1994) Molecular markers, natural history, and evolution. Chapman and Hall, New York, New York, USA
- Avise, J.** (2000) Phylogeography. Harvard University Press, Massachusetts, pp 446.
- Ayre, D., Minchinton, T. & C. Perrin** (2009) Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Molecular Ecology*, 18, 1887-1903.
- Bandelt H., Forster, P. & A. Röhl** (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.
- Beerli, P.** (2011) MIGRATE-n Version 3.2.17: Migrate Documentation. <http://popgen.csit.fsu.edu/migrate.download.html>.
- Broitman, B, Navarrete, S., Smith, F. & S. Gaines** (2001) Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. *Marine Ecology Progress Series*, 224, 21–34.
- Bohonak, A.** (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74(1), 21–45.
- Burban, C., R. Petit, Carcreff, E. & H. Jactel** (1999) Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology*, 8, 1593-1602.

**Cárcamo, P., Candia, A. & O. Chaparro** (2005) Larval development and metamorphosis in the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea): Effects of diet type and feeding frequency. *Aquaculture*, 249, 375-386.

**Cárdenas, L., Castilla J.C. & F. Viard** (2009) A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *Journal of Biogeography*, 36, 969–981

**Camus, P.** (2001) Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74, 587–617.

**Collin, R.** (2001) The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda : Calyptraeidae). *Molecular Ecology*, 10, 2249–2262.

**Corrège, T., Delcroix, T., Recy, J., Beck, W., Cabioch, G. & F. Le Cornec** (2000) Evidence for stronger El Niño-Southern Oscillation (ENSO) events in a mid-Holocene massive coral. *Paleoceanography*, 15(4), 465-470

**Cowen, R. & S. Sponaugle** (2009) Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annual Review Marine Science*, 1:443–66.

**Dawson, M.** (2001) Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography*, 28, 723–736.

**Dawson, M.** (2005) Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography*, 32, 515–533.

**Dawson, M., Waples, R. & G. Bernardi** (2006) Phylogeography. In: *The Ecology of Marine Fishes: California and Adjacent Waters*. University of California Press. pp 26-54.

**Dawson, M., Barber, P., González-Guzmán, L., Toonen, R., Dugan, J. & R. Grosberg** (2011) Phylogeography of *Emerita analoga* (Crustacea, Decapoda, Hippidae), an eastern Pacific Ocean sand crab with long-lived pelagic larvae. *Journal of Biogeography*, 38, 1600-1612.

**Debenham, P., Brzezinski, M., Foltz, K. & S. Gaines** (2000) Genetic structure of populations of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 253, 49-62.

**Díaz, A., Féral, J., David, B., Saucedo, T. & E. Poulin** (2011) Evolutionary pathways among shallow and deep-sea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research II*, 58 (1–2), 205–211.

**Drummond, A., Rambaut, A., Shapiro, B. & O. Pybus** (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology Evolution*, 22, 1185–1192.

**Drummond, A., Ashton, B. & S. Buxton** (2011) Geneious. Biomatters Ltd.

**Dupanloup, I., Schneider, S. & L. Excoffier** (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571–2581.

**Duran, S., Palacín, C., Becerro, M., Turon, X. & G. Giribet** (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*, 13, 3317–3328.

**Espejo, A., Galleguillos, R., & S. Ferrada** (2004) Isozyme analysis in the sea urchin *Loxechinus albus*. Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture. Sea Urchins: Fisheries and Aquaculture. Ed: J. Lawrence and O. Guzmán. Florida, USA.

**Excoffier, L., Smouse, P. & J. Quattro** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1313, 479-491.

**Excoffier, L. & H. Lischer** (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.

**Faugeron, S, Valero, M., Destombe, C., Martin, E. & J. Correa** (2001) Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37: 705–716.

**Filatov, D.** (2002) ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2, 621–624

**Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & R. Vrijenhoek** (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

**Freeland, J.** (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.

**Fu, Y.** (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.

**Fuentes, I. & C. Barros** (2000) Larval development and metamorphosis of cultured *Tetrapyrgus niger* (Echinodermata: Echinoidea). An uncommon form of echinoplutei. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37, 201-209.

**Gawarkiewicz, G., Monismith, S. & J. Largier** (2007) Observing Larval Transport Processes Affecting Population Connectivity: Progress and Challenges. *Oceanography*, 20(3), 40–53.

**Gebauer, P. & C. Moreno.** (1995) Experimental validation of the growth rings of *Loxechinus albus* (Molina 1972) in the southern Chile (echinodermata: echinoidea). *Fisheries Research*, 21, 423-235.

**Geyer, C. & E. Thompson** (1995) Annealing Markov-chain Monte-Carlo with applications to ancestral inference. *Journal of the American Statistical Association*, 90, 909-920.

**Gilg, M. & T. Hilbish** (2003) The geography of marine larval dispersal: coupling genetics with fine-scale physical oceanography. *Ecology*, 84(11), 2989-2998.

**Goldson, A., R. Hughes & C. Gliddon** (2001) Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: a case study with bryozoans. *Marine Biology*, 138(5), 1037-1042.

**Goldstein, S., D. Schiel & N. Gemmell** (2006) Comparative phylogeography of coastal limpets across a marine disjunction in New Zealand. *Mol Ecol* 15: 3259–3268.

**González, L., Castilla, J.C. & Ch. Guisado** (1987) Effect of larval diet and rearing temperature on metamorphosis and juvenile survival of the edible sea urchin *Loxechinus albus* (Molina 1782) (Echinoidea, Echinidae). *Journal of Shellfish Research*, 6, 109–115.

**Grosberg, R. & C. 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.

**Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & J. Cosson** (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(3), 1261-1280.

**Guillot, G.** (2008) Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation. The correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics*, 24, 2222-2228.

**Guillot, G. & F. Santos** (2009) A computer program to simulate multilocus genotype data with spatially auto-correlated allele frequencies. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1112-1120.

**Guillot, G., Leblois, R., Coulon, A. & A. Frantz** (2009) Statistical methods in spatial genetics, *Molecular Ecology*, 18, 4734–4756.

**Guisado C. & JC. Castilla JC** (1987) Historia de vida, reproducción y avances en el cultivo del erizo comestible chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinoidea: Echinidae) In: Arana P (Ed) Manejo y Desarrollo Pesquero. Editorial Universitaria, Valparaíso.

**Haye, P., Salinas, P., Acuña, E. & E. Poulin.** (2010) Heterochronic phenotypic plasticity with lack of genetic differentiation in the southeastern Pacific squat lobster *Pleuroncodes monodon*. *Evolution and Development*, 12, 627–633.

**Haye, P., N. Segovia, N. Muñoz-Herrera, F. Gálvez, A. Martínez, A. Meynard, M. Pardo-Gandarillas, E. Poulin & S. Faugeron** (2014) Phylogeographic Structure in Benthic Marine Invertebrates of the Southeast Pacific Coast of Chile with Differing Dispersal Potential. *PLoS ONE* 9(2): e88613. doi:10.1371/journal.pone.0088613.

**Harpending, H.** (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591-600.

**Hereu, B., Zavala, M. & C. Linares** (2004) Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Marine Biology*, 144, 1011-1018.

**Hewitt, G.** (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.

**Ho, S. & B. Shapiro** (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11, 423–434.

**Holsinger, K. & B. Weir** (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . *Nature Reviews Genetics*, 10, 639-650.

**Hooker, Y., Prieto-Ríos, E. & F. Solís-Marín** (2013) Echinoderms of Perú. In: *Echinoderms Research and Diversity in Latin America*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 277-299.

**Hulton, N., Purves, R., McCulloch, R., Sugden, D. & M. Bentley** (2002) The Last Glacial maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews*, 21, 233–241.

**Ibáñez, C., Camus, P. & F. Rocha** (2009) Diversity and distribution of cephalopod species of the coast off Chile. *Marine Biology Research* 5(4): 374-384.

**Ibáñez, C., Cubillos, L., Tafur, R., Argüelles, J., Yamashiro, C. & E. Poulin** (2011) Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System. *Marine Ecology Progress Series*, 431, 163-171.

**Iuri, V., F. Patti & G. Procaccini** (2007) Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (echinodermata: Echinoidea): First insights from the south tyrrhenian sea. *Biodiversity in Enclosed Seas and Artificial Marine Habitats Developments in Hydrobiology*, 193, 77-84.

- Jablonski, D.** 1986. Larval ecology and macroevolution in marine invertebrates. *Bulletin of Marine Science*. 39, 565-587.
- Kaiser, J., Lamy, F. & D. Hebbeln** (2005) A 70-kyr sea surface temperature record off southern Chile (Ocean Drilling Program Site 1233). *Paleoceanography*, 20: 4, PA4009.
- Kass, R. & A. Raftery** (1995) Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90, 773-795.
- Kelly, R. & S. Palumbi** (2010) Genetic structure among 50 species of the northeastern pacific rocky intertidal community. *PLoS ONE* 5(1): e8594. doi:10.1371/journal.pone.0008594.
- Kino, S. & Y. Agatsuma** (2007) Reproduction of sea urchin *Loxechinus albus* in Chiloé Island, Chile. *Fisheries Science*, 73, 1265-1273.
- Kyle, C. & E. Boulding** (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology* 137: 835-845.
- Kuo, C. & J. Avise** (2005) Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance across gene trees. *Genetica*. 124: 179-186.
- Koutavas, A., Lynch-Stieglitz, J., Marchitto, T.M., and Sachs, J.P.,** (2002) El Niño-like pattern in ice age tropical Pacific sea surface temperature. *Science*, 297: 226–230

**Larraín, A.** (1975) Los equinoideos regulares fósiles y recientes de Chile. *Gayana Zoológica*, 35, 189 p.

**Lee, H. & E. 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.

**Lessios, H., Robertson, D. & G. Paulay** (1999) Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution*, 53, 806-817.

**Lessios, H., Kessing, B. & J. Pearse** (2001) Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution*, 55, 955-975.

**Lessios, H., Kane, J. D. Robertson** (2003). Phylogeography of the pantropical sea urchin *Tripneustes*: contrasting patterns of population structure between oceans. *Evolution*, 57, 2026-2036.

**Lessios, H.** (2012) A sea water barrier to coral gene flow. *Molecular Ecology*, 21, 5390–5392.

**Librado, P. & Rozas, J.** (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

**Maltagliati, F., Di Giuseppe, G., Barbieri, M., Castelli, M. & F. Dini** (2010) Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*

(Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100, 910–923.

**Marko, P., Hoffman, J., Emme, S., Mcgovern, M., Keever, C. & L. Cox** (2010) The ‘Expansion–Contraction’ model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change?. *Molecular Ecology* 19, 146–169.

**McCartney, M., Keller, G. & H. Lessios** (2000) Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and Eastern Pacific sea urchin of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology*, 9, 1391-1400.

**McEdward, L. & B. Miner** (2001) Larval and life-cycle patterns in echinoderms. *Canadian Journal of Zoology*. 79, 1125–1170.

**Minin, V., Bloomquist E. & M. Suchard** (2008) Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1459–1471.

**Montecinos, V., Strub, P., Chavez, F., Thomas A., Tarazona J. & T. Baumgartner** (2005) Bio-physical interactions off western South America. In: *The sea*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 329–390.

**Montecinos, A., Broitman, B., Faugeron, S., Haye, P., Tellier, F. & M. Guillemin.** (2012) Species replacement along a lineal coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east Pacific. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 97.

**Moore, J.** (2006) An Introduction to the Invertebrates. 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge University Press, London, UK, 319 p.

**Moreno, C., Barahona, N., Molinet, C., Orensanz, J., Parma, M. & A. Zuleta** (2006) From crisis to institutional sustainability in the Chilean sea urchin fishery. In: Fisheries management: progress towards sustainability. McClanahan & Castilla (Eds). Blackwell Publishing, Mombasa, pp. 43-67.

**Moreno, C., Molinet, C., Diaz, P., Diaz, M., Codjambassis, J., & A. Arevalo** (2011) Bathymetric distribution of the chilean red sea urchin (*Loxechinus albus*, Molina) in the inner sea of northwest patagonia: implications for management. Fisheries Research, 110(2), 305-311.

**Mohtadi M., Romero O.E., Hebbeln D.,** (2004). Changing marine productivity off northern Chile during the past 19,000 years: a multi-variable approach. Journal of Quaternary Science, 19: 347-360.

**Navarrete, A., Camus, P. & F. Opazo** (2008) Variación ambiental y patrones dietarios del erizo negro *Tetrapyrgus niger* en costas intermareales rocosas del norte de Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 81, 305-319.

**Newton, M. & A. Raftery** (1994) Approximate bayesian-inference with the weighted likelihood bootstrap. Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological, 56, 3-48.

**Palacin, C., Giribet, G., Carner, S., Dantart, L. & X. Turon** (1998) Low density of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the western Mediterranean. *Journal of Sea Research*, 39, 281-290.

**Palumbi, S.** (1996) What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 203, 75–92.

**Palumbi, S.** (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13: 146-158.

**Pardo-Gandarillas, M.C.** (2012) Aproximaciones filogeográficas para evaluar patrones de conectividad e historia demográfica en dos especies de pulpos, habitantes de distintas provincias biogeográficas de Sudamérica: Importancia de las glaciaciones y de las condiciones oceanográficas contemporáneas. Tesis Doctoral, Universidad de Chile.

**Pechenik, J.** (1999) On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series*, 177, 269-297.

**Pelc, R., Warner, R. & S. Gaines** (2009) Geographical patterns of genetic structure in marine species with contrasting life histories. *Journal of Biogeography*, 36, 1881-1890.

**Pike, N.** (2011) Using false discovery rates for multiple comparisons in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, 278–282.

**Pons, O. & R. Petit** (1995) Estimation, variance and optimal sampling of genetic diversity. I. Haploid locus. *Theoretical Applied Genetics*, 90, 462-470.

**Pons, O. & R. Petit** (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144, 1237-1245.

**Posada, D.** (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.

**Raftery, A.** (1996) Aproximate bayes factor and accounting for model uncertainty in generalized linear models. *Biometrika*, 83, 251-266.

**Rambaut, A. & A. Drummond, A.** (2009) Tracer v1.5. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.

**Rivadeneira, M., Fernández, M. & S. Navarrete** (2002) Latitudinal trends of species diversity in rocky intertidal herbivore assemblages: spatial scale and the relationship between local and regional species richness. *Marine Ecology Progress Series*, 245, 123–131.

**Rodriguez, S. & P. Ojeda** (1993) Distribution patterns of *Tetrapyrgus niger* (Echinodermata: Echinoidea) off the central Chilean coast. *Marine Ecology Progress Series*, 101, 157-162.

**Rogers, A. & H. Harpending** (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552-569.

**Ross, P., Hogg, I., Pilditch, C. & C. Lundquist** (2009) Phylogeography of New Zealand's coastal benthos. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43, 1009-1027.

**Sánchez, R., R. Sepúlveda, A. Brante & L. Cárdenas** (2011) Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Marine Ecology Progress Series*, 434, 121–131.

**Scheltema, R.** (1971) Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow water benthic marine gastropods. *Biological Bulletin*, 140, 284-322.

**Scheltema, R.** (1986a) Long-distance dispersal by planktonic larvae of shoal-water benthic invertebrates among central Pacific Islands. *Bulletin of Marine Sciences*, 39, 241-256.

**Scheltema, R. S.** (1986b) On dispersal and planktonic larvae of benthic invertebrates: an eclectic overview and summary of problems. *Bulletin of Marine Sciences*, 39, 290-322.

**Schuhbauer, A., Brickle, P. & A. Arkhipkin** (2010) Growth and reproduction of *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) at the Southerly peripheries of their species range, Falkland Islands (South Atlantic). *Marine Biology*, 157, 1837-1947.

**Slatkin, M. & R. Hudson** (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555- 562.

- Smith, A.** (1997) Echinoderm larvae and phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 28, 219-241.
- Sotka, E. & S. Palumbi** (2006) The use of genetic clines to estimate dispersal distances. *Ecology*, 87(5), 1094–1103.
- Stotz, W.** (2003) Sea-urchin fisheries: A Chilean perspective. In: Lawrence JM (ed). *Sea urchins fisheries and ecology*, pp. 3-17. Destech Publications, Puerto Varas.
- Strub, T., Mesias, J., Montecinos, V., Rutllant, J. & S. Salinas** (1998) Coastal ocean circulation off western South America. In: *The Sea*. John Wiley & Sons, New York. pp. 273–313.
- Suchard, M., Weiss, R. & J. Sinsheimer** (2001) Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1001–1013.
- Tajima, F.** (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tellier, F., A. Meynard, J. Correa, J. 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 Evolution*, 53, 679–693.
- Teske, P, Von der Heyden, S., McQuaid, C. & N. Barker** (2011) A review of marine phylogeography in southern Africa. *South African Journal of Science*, 107, 1-11.

- Thiel, M., Macaya, E., Acuña, E., Arntz, W., Bastias, H., Brokordt, K, Camus, P., Castilla, J.C., Castro, L., Cortés, M., Dumont, C.P., Escribano, R., Fernández, M., Lancelloti, D., Gajardo, J.A., Gaymer, C.F., Gomez, I., González, A.E., González, H., Haye, P., Illanes, J., Iriarte, J., Luna-Jorquera, G., Luxoro, C., Manríquez, P., Marín, V., Muñoz, P., Navarrete, S., Pérez, E., Poulin, E., Sellanes, J., Sepúlveda, A., Stotz, W., Tala, F., Thomas, A., Vargas, C., Vásquez, J. & A. Vega (2007)** The Humboldt Current System of Northern and Central Chile: oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. An Annual Review: Oceanography and Marine Biology, 45, 195–344.
- Todd, C., W. Lambert & J. Thorpe (1998)** The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages: are pelagic larvae "for" dispersal?. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 228, 1-28.
- Vásquez, J. & G. Donoso (2013)** Chapter 20: *Loxechinus albus*. In: Sea Urchins: Biology and Ecology. Ed. J. Miller Lawrence, 285-296
- Vergara, A. (2001)** Caracterización genética poblacional para el manejo y la conservación de recursos marinos de importancia para la acuicultura y la pesquería. Instituto de Fomento Pesquero, División de Fomento de la Acuicultura. Proyecto FIA BID-PI-C-2001-1-M-068.
- Waters, J. & M. Roy (2004)** Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? Molecular Ecology, 13, 2797–2806.

**Waters, J., King, T., O'Loughlin, P. & H. Spencer** (2005) Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. *Molecular Ecology*, 14, 2789–2802.

**Waters, J., G. McCulloch, & J. Eason** (2007) Marine biogeographical structure in two highly dispersive gastropods: implications for trans-Tasman dispersal. *Journal of Biogeography*, 34, 678–687.

**Weersing, K. & R. Toonen** (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 1–12

**Wray, G. & E. Bely** (1994) The evolution of echinoderm development is driven by several distinct factors. *Development Supplement*, 97-106

**Yang, Z.** (2006) *Computational Molecular Evolution*. Oxford University Press, Oxford, England, 319 p.

**Zakas C., Binford, J., Navarrete S. & J. Wares** (2009) Restricted gene flow in Chilean barnacles reflects an oceanographic and biogeographic transition zone. *Marine Ecology Progress Series*, 394, 165-177.

**Zamora, S. & W. Stotz.** (1993). Ciclo reproductivo de *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en dos localidades de la IV Región, Coquimbo, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66: 155-169.

**Zamora, S. & W. Stotz** (1992) Ciclo reproductivo de *Loxechinus albus* (Molina 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en Punta Lagunillas IV Región, Coquimbo, Chile, Revista Chilena de Historia Natural, 65, 121-133.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Protocolo de Extracción de ADN Total: Método de Sales Modificado (Erizos)

1. Extraer espinas (5 aproximadamente) y tejido gonádico ( $0.25 \text{ cm}^2$  app.) y depositar en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente identificados
2. Dejar secar tejidos para evaporar todo el etanol residual (T:  $60^\circ\text{C}$ , t: 50-60 min.)
3. Agregar 440 uL Buffer de extracción salina + 44 uL SDS 20% + 8 uL Proteinasa K (20 mg/mL)
4. Colocar en vórtex algunos segundos
5. Incubar los tubos (T:  $60^\circ\text{C}$ , t: 12 hrs.)
6. Centrifugar algunos segundos para hacer descender los restos de las paredes del tubo
7. Agregar 300 uL Solución salina 6M
8. Colocar en vórtex cada tubo (t: 1 min.)
9. Centrifugar los tubos (rpm: 10300, t: 40 min.)
10. Transferir 600 uL del sobrenadante y depositar en un nuevo tubo de 1,5 mL previamente IDENTIFICADO
11. Agregar 600 uL Isopropanol frío (T:  $-20^\circ\text{C}$ )
12. Mezclar el contenido del tubo invirtiéndolos algunas veces
13. Incubar los tubos (T:  $-20^\circ\text{C}$ , t: 4hrs.)
14. Centrifugar los tubos (rpm: 13000, T:  $4^\circ\text{C}$ , t: 40 min.)
15. Retirar sobrenadante con pipeta sin tocar el fondo de los tubos y secar con papel
16. Agregar 200 uL Etanol 70% frío (T:  $-20^\circ\text{C}$ )
17. Centrifugar los tubos (rpm: 13000, T:  $4^\circ\text{C}$ , t: 25 min.)
18. Retirar sobrenadante con pipeta sin tocar el fondo de los tubos y secar con papel
19. Dejar secar el pellet (T:  $60^\circ\text{C}$ , t: 2 hrs.)
20. Disolver en  $\text{H}_2\text{O}$  (V: 75-100 mL)