

UCH-FC  
MAG-B  
V 152  
C. 1

Conectividad entre la Isla de Pascua y la Isla Salas y Gómez: diferenciación genético poblacional del pez de importancia cultural *Kyphosus sandwicensis* (Sauvage, 1880).

## Tesis

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Evelyn Maryorie Valencia Pacheco

Octubre, 2016

Director de Tesis Dr. David Veliz  
Co-Director de Tesis Dr. Caren Vega-Retter



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

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

Evelyn Maryorie Valencia Pacheco

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 07 de Septiembre de 2016.

Director de Tesis:  
Dr. David Véliz

  
.....

Co-Director de Tesis  
Dr. Caren Vega-Retter

  
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandra González

  
.....

Dr. Elie Poulin

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor David Veliz y Cotutora Caren Vegra-Retter, por su esfuerzo, dedicación y comprensión, agradecer su empatía y motivación en su labor docente, que han sido fundamentales para mi desarrollo personal y formación académica. También agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Limnología y Ecología Molecular y la Dra. Erika Meerhoof que de una u otra manera participaron en el desarrollo de esta tesis, siempre con buena disposición.

Por otro lado, agradecer al grupo Núcleo Milenio de Ecología y Manejo Sustentable de Islas Oceánicas (ESMOI), con su proyecto: Núcleo Milenio NC120030 "Ecología y Manejo Sustentable de Islas Oceánicas" y a Beca Conicyt 22130654 por el financiamiento. Finalmente, quiero agradecerles a mi familia, Alejandro y mi Hija Amanda, por sus palabras de apoyo y sonrisitas en los momentos más difíciles.



Evelyn Valencia, Bióloga y Profesora de educación media de la Universidad de Concepción y Andrés Bello respectivamente. Posee distinción académica, mejor rendimiento de su generación y una publicación científica, ha realizado diversas presentaciones en congresos científicos y participado en cursos teóricos prácticos, ambos en el área de la ecología, evolución y sobre especies introducidas. Buscando perfeccionarse en el área de la investigación, gracias al financiamiento de Conicyt emprende un desafío en el Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile. A sus 28 años finaliza sus estudios gracias al constante esfuerzo y dedicación, hoy es el primer profesional de su familia y actualmente se desempeña como docente en un destacado preuniversitario.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de tablas. ....	iv
Lista de figuras. ....	v
Resumen. ....	vi
Abstract. ....	viii
Introducción. ....	1
Hipótesis. ....	10
Objetivos. ....	10
Materiales y métodos. ....	11
Resultados. ....	16
Discusión. ....	24
Conclusiones. ....	31
Bibliografía. ....	33

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Indicadores de variabilidad genética basadas en las secuencias de la región control. N: total individuos, S: número de sitios polimórficos, K: número de haplotipos, H: diversidad haplotípica,  $\Pi$ : diversidad nucleotídica.

**Tabla 2** Variables genéticas estimadas para cada loci. *n*: número de individuos, *Na*: número de alelos, *RA*: riqueza alélica, *DG*: Diversidad genética, *H<sub>O</sub>*: heterocigosidad observada, *H<sub>E</sub>*: heterocigosidad esperada, *F<sub>IS</sub>*: coeficiente de consanguinidad y su significancia estadística. *FDR*: valor de probabilidad corregido con el método FDR (corrección falsos positivos). \*  $P < 0,05$  para desviaciones significativas de lo esperado para HWE.

**Tabla 3.** Valores promedio para diversidad genética (*DG*), riqueza alélica (*RA*) y número de alelos totales para IP y SG (NAT).

**Tabla 4.** Tasa de migración histórica (*MH*) y migrantes efectivos históricos (*MEH*) entre IP y SG.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Batimetría de 0 a 4000 metros modificada de Testa (2014). Se indica el sitio de estudio IP: isla de Pascua; SG: isla Salas y Gómez.

**Figura 2.** Patrones de circulación superficial en el océano Pacífico Sur, coincidente con la morfología del fondo marino, relacionada a la presencia de crestas y las cadenas de montes submarinos. Figura de Pollok (1992).

**Figura 3.** Ordenación genética entre las especies de *kyphosus* inferido desde el software Mega basado en ADN mitocondrial (COI). Los valores de nodos indican el valor de bootstrap. Las secuencias NanueIP23, IP22, IP25 provienen de IP y las nanueSG1, SG2, SG3, SG4 provienen de SG. Las otras secuencias fueron obtenidas desde GenBank, se indica el número de acceso y la ubicación correspondiente.

**Figura 4.** Distancia genética (diferencias en el número de pares de bases) entre los individuos de *Kyphosus* obtenidos desde GenBank (eje X) y los 44 individuos muestreados de IP y SG. SG4 corresponde al único individuo que mostro diferencias con los demás individuos muestreados, los 43 individuos restantes coinciden en la distancia genética.

**Figura 5.** Red de haplotipos mediante el método de Templeton TCS para los 44 individuos de IP (Cluster1) y SG (Cluster2). Basada en secuencias de la Región Control (ADN mitocondrial). El tamaño de los haplotipos es proporcional a su frecuencia y los números entre haplotipos representan el número de pasos mutacionales.

## RESUMEN

La conectividad poblacional tiene importantes implicancias en la persistencia de las poblaciones en espacio y tiempo debido a su rol fundamental en la dinámica metapoblacional y en la resiliencia poblacional después de perturbaciones. Al respecto, sistemas insulares como la isla de Pascua (IP) y la isla Salas y Gómez (SG), constituyen un modelo ideal para estudiar la conectividad, porque son dos sistemas aislados en el Océano Pacífico, donde el proceso de dispersión estaría jugando un rol fundamental para la persistencia de sus poblaciones. El objetivo de esta tesis fue determinar la estructuración genético poblacional y los patrones de flujo génico históricos de *Kyphosus sandwicensis* entre la IP y SG. Además, mediante el uso de marcadores mitocondriales (COI y Región Control) se intentó realizar una identificación molecular de la especie y se evaluó la existencia de estructura filogeográfica. Finalmente, usando 16 microsatélites descritos para la especie se estimó el grado de diferenciación genética entre las poblaciones geográficas y el patrón de migración recíproca. EL gen COI mostró alta similitud con las especies *K. sectatrix* y *K. bigibbus*, distanciadas genéticamente por una sola base nucleotídica, pudiendo probablemente tratarse de la misma especie. La Región Control no detectó un patrón filogeográfico de los haplotipos analizados, por lo que IP y SG no han estado separadas poblacionalmente en el tiempo. La variabilidad genética de los microsatélites analizados no muestra diferencias en la frecuencia alélica de los individuos de *K. sandwicensis*

presentes en IP y SG por lo que serían parte de una misma población. Las dos islas mostraron elevado y similares índices de diversidad genética, nucleotídica y riqueza alélica, coincidiendo con la ausencia de cuellos de botella recientes. Los análisis de flujo génico histórico sugieren dispersión en ambas direcciones con un mayor aporte desde SG a IP. Los resultados de conectividad entre estas islas constituyen la primera evidencia de una conectividad genética entre estas dos islas oceánicas. Este patrón de flujo génico estaría potencialmente determinado por las condiciones oceanográficas imperantes en la zona, que incluyen: discontinuidades oceanográficas, variabilidad de las corrientes oceánicas, remolinos mesoescala y por el probable mecanismo de dispersión de *k. sandwicensis* por rafting en algas *Sargassum*, lo cual podría proporcionar la oportunidad de dispersar grandes distancias y nos permite comprender como una población compuesta por individuos distanciados por 415km, puede mantener la conectividad genética.

## ABSTRACT

Population connectivity has a fundamental role in metapopulation dynamics and population resilience after disturbances with important implications for the population persistence in space and time. In this regard, island systems such as Easter Island (IP) and the island Salas y Gómez (SG) are ideal places for studying population connectivity, because they are two isolated systems in the Pacific Ocean, where the dispersal process would playing a critical role to the persistence of their populations. The aim of this thesis was to determine the genetic population structure and historical gene flow patterns of *Kyphosus sandwicensis* between IP and SG. Through the use of mitochondrial markers (COI and Region Control) it was attempted a molecular identification of the species and assess the existence of phylogeographic structure. Finally, using 16 microsatellite developed for the species, it was estimated the degree of genetic differentiation between the geographic populations and the reciprocal migration pattern. The COI gene showed high similarity with the species *K. sectatrix* and *K. bigibbus*, genetically distanced by a single nucleotide base, may probably be the same species. The Control Region did not detect a phylogeographical pattern, pointed out that populations of IP and SG have not been separated in the time. Moreover, the genetic variability of the microsatellites analyzed did not show differences between the allelic frequency of the individuals from IP and SG so they would be

part of the same population. The two islands showed high and similar rates of genetic diversity and allelic richness nucleotide, according with the absence of recent bottleneck. The Historical gene flow analyzes suggest dispersal in both directions, being higher from SG to IP. Our results of connectivity between IP and SG are the first evidence of a genetic connectivity between these two oceanic islands. This pattern of gene flow would be potentially determined by the oceanographic conditions predominant in the area, which includes: oceanographic discontinuities, ocean currents fluctuations, mesoscale eddies, and by the probable dispersal mechanism of *k. sandwicensis* by rafting using the *Sargassum* algae, which could provide the opportunity to disperse large distances and allows us to understand how a population composed of individuals separated by 415km, can maintain genetic connectivity.

## INTRODUCCION

El estudio de la conectividad proporciona un marco teórico fundamental para comprender los procesos que subyacen a la distribución y abundancia de las poblaciones, principal objetivo en ecología marina (Cowen *et al.*, 2007). Sin embargo, estimaciones directas de conectividad son escasas (Cowen *et al.*, 2006) principalmente por las dificultades de medir dispersión a grandes escalas espaciales, la complejidad de la hidrodinámica marina y la variación en las estrategias de historia de vida de las especies (Weersing & Toonen, 2009). No obstante, la reciente proliferación de herramientas estadísticas y moleculares, han permitido la estimación indirecta de conectividad (Cowen & Spounagle, 2009), promoviendo así el estudio de dispersión y conectividad poblacional. De hecho, la genética de poblaciones ha sido el enfoque más usado para hacer inferencias sobre conectividad y dispersión en los diferentes grupos taxonómicos de organismos marinos (Helberg, 2007). Si bien, se observa un sesgo hacia algunos grupos tales como: peces, seguido por corales y moluscos principalmente (Jones *et al.*, 2009), existen escasos estudios de conectividad y diferenciación genética centrados en poblaciones marinas insulares (Beli, 2008).

La importancia de la conectividad poblacional, radica principalmente en el significativo rol que juega en escalas de tiempo ecológicas y evolutivas (Weersing & Tooner, 2009), además del

valor económico y social que ha adquirido (Christie *et al.*, 2010), ya que favorece la vinculación entre poblaciones humanas, que pueden ser beneficiadas por la gestión ambiental aplicada en una zona del océano. Como consecuencia, autores han centrado su investigación en diferentes aspectos. Por ejemplo, Cowen *et al.*, (2007) destacan el rol fundamental de la conectividad en la dinámica metapoblacional, estructura comunitaria, diversidad genética y en la resiliencia a perturbaciones naturales y las inducidas por humanos. Por lo tanto, la conectividad tiene importantes implicancias en la persistencia de las poblaciones en espacio y tiempo.

Un componente esencial para determinar los patrones y la magnitud del movimiento de los organismos entre las poblaciones, es el proceso de dispersión, que depende principalmente de la estrategia de movimiento de la especie y de las características abióticas del hábitat residente. De acuerdo a Hixon *et al.*, (2002), el movimiento de especies bentónicas y demersales entre poblaciones locales aisladas, ocurre a través de dispersión de larvas pelágicas, esporas u otros propágulos. La extensión de esta dispersión varía en un amplio rango, la cual va desde metros hasta miles de kilómetros y tradicionalmente ha sido asociada a la duración del estado larval (Kinlan & Gaines, 2003; Cowen *et al.*, 2007). Sin embargo, para que la dispersión sea exitosa, es fundamental que la larva encuentre un hábitat de asentamiento adecuado (Cowen *et al.*, 2006), de modo que los individuos sobrevivan y se reproduzcan en la nueva población, contribuyendo así al pool genético (Hedgecock *et al.*, 2007). Este proceso, es responsable de homogeneizar las poblaciones y mantener la cohesión genética a través del tiempo (Mayr, 1963), pudiendo existir variaciones importantes debido a cambios espaciales y temporales (Bay *et al.*, 2008). Todas estas variaciones en el flujo génico pueden afectar finalmente la estructura genética de las poblaciones.

Numerosas investigaciones han evidenciado la importancia de considerar los patrones de dispersión de las especies, para desarrollar estrategias de conservación (Cowen *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007; Bell, 2008; Planes *et al.*, 2009), diseño de reservas marinas (RM) y Áreas marinas Protegidas (AMP), sugeridas como la única herramienta de conservación efectiva (Hughes *et al.*, 2003; Palumbi, 2003). En este sentido, considerar los patrones de conectividad podría maximizar la efectividad de estas áreas (Bay *et al.*, 2008), ya que las AMP deben estar vinculadas a otras zonas marinas protegidas y ser simultáneamente autosustentables con el fin de promover la persistencia de las poblaciones (Planes *et al.*, 2009). Pero, aunque la conectividad ha sido reconocida como un componente importante, rara vez ha sido considerada en el proceso de designación (Bell, 2008) y las AMP continúan siendo diseñadas e implementadas, sin conocer los patrones de dispersión reales de las especies involucradas (Jones *et al.*, 2009).

Por lo tanto, incrementar el conocimiento de la conectividad poblacional se hace imprescindible para la conservación de la biodiversidad marina, la cual presenta alta prioridad con las crecientes amenazas actuales (Jones *et al.*, 2007). En especies comerciales, la explotación pesquera es la amenaza más importante, evidenciándose que promueve una serie de efectos negativos directos e indirectos, que impactan sobre la ecología y genética de las poblaciones (Lewin *et al.*, 2006). Una de las más notables consecuencias de la pesca es la disminución de los tamaños poblacionales (N), lo cual también se puede reflejar en la reducción de los rangos de distribución de las especies (Hutchings & Reynold, 2004). Estos cambios en el N afectan directamente el tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) y la variación genética (Frankham, 1996), siendo generalmente  $N_e$  inferior al N en organismos marinos (Palumbi, 1994; Hauser *et al.*, 2002; De Oliveira *et al.*, 2005), debido a cambios demográficos pasados o actuales y a la alta

varianza reproductiva (Broquet *et al.*, 2013). Uno de los ejemplos empíricos más conocidos, es lo que ocurre con el pez *Pagrus auratus* en Nueva Zelanda. Esta especie redujo dramáticamente el tamaño de sus poblaciones por efecto de la sobrepesca, lo cual influyó negativamente en su diversidad genética (Hauser *et al.*, 2002). Al respecto, se ha señalado que cambios en la diversidad genética, podrían afectar la habilidad de las poblaciones para adaptarse a futuros cambios ambientales (Van Straalen & Timmermans, 2002), debido a que una reducida diversidad genética es un obstáculo para la recuperación frente a eventos estocásticos. Por lo tanto, poblaciones pequeñas como las insulares o aquellas que han sufrido recientes cuellos de botella, serían más susceptibles a las perturbaciones (Frankham, 1995).

En sistemas insulares y aislados como la isla de Pascua (IP) y la isla Salas y Gómez (SG), ubicadas en el océano Pacífico Sur y separadas por 415km (Zilich *et al.*, 2014) (Fig. 1), el proceso de dispersión es fundamental para la persistencia de sus poblaciones y recuperación luego de perturbaciones. Ambas islas constituyen importantes hotspots de biodiversidad (Roberts *et al.*, 2002) y poseen AMP para conservar su elevado endemismo. En la isla SG se creó recientemente el parque Motu Motira Hiva con un área de 150.000 km<sup>2</sup>, que corresponde a la zona de exclusión de pesca más grande de América (Friedlander *et al.*, 2013) y en IP, existen los parques submarinos: Coral Nui Nui, Motu Tautara y Hanga Oteo con 1.83 km<sup>2</sup> (Rovira *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce el nivel de conectividad entre sus poblaciones y su efecto sobre la diversidad genética. Por lo tanto, comprender el proceso de conectividad entre IP y SG, es fundamental para contribuir a la comprensión de la dinámica poblacional de especies expuestas a importantes cambios producto del efecto antrópico.

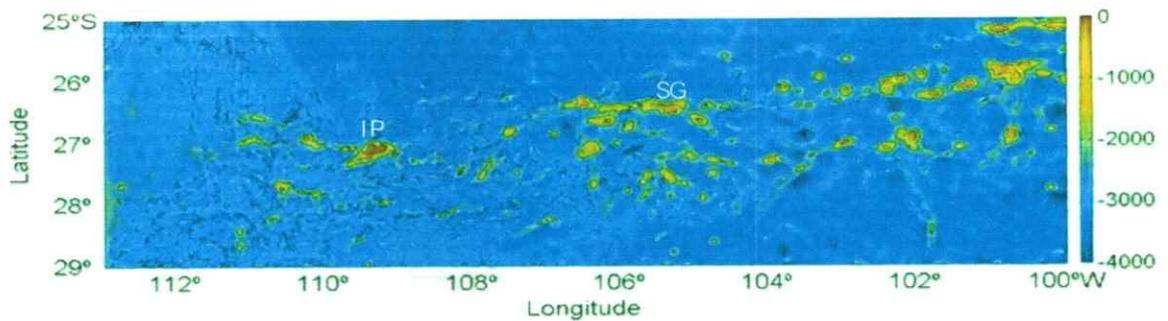


Figura 1. Batimetría de 0 a 4000 metros modificada de Testa (2014). Se indica el sitio de estudio IP: isla de Pascua; SG: isla Salas y Gómez.

Es importante considerar que no solo los procesos de dispersión son relevantes en determinar la forma en que los organismos se mueven, sino también los factores abióticos y componentes del paisaje (Romero & Acosta 2012). Específicamente en el Océano Pacífico Sur, la dispersión de especies con larvas de desarrollo prolongado, como los peces de arrecife, que en los primeros estadios de desarrollo son extremadamente móviles (Bernardi, 2000), se vería favorecida por el sistema de celdas de circulación formados por las cadenas de montes submarinos del Pacífico sudeste, como son la dorsal Salas y Gómez, a la cual pertenece isla de Pascua (Pollock, 1992; Rivera & Mujica, 2004).

Estudios oceanográficos, han señalado que la circulación asociada a la IP y SG corresponde al giro anticiclónico del Pacífico Sur, donde la dispersión de los organismos estaría limitada hacia el este, condicionada por un sistema de flujos-contraflujos y la corriente geostrofica promedio de la zona (Pollock, 1992; Rivera & Mujica, 2004; Tapia, 2010, Testa, 2014), sugiriendo por lo tanto, una mayor conectividad biológica de IP hacia SG (Fig. 2).

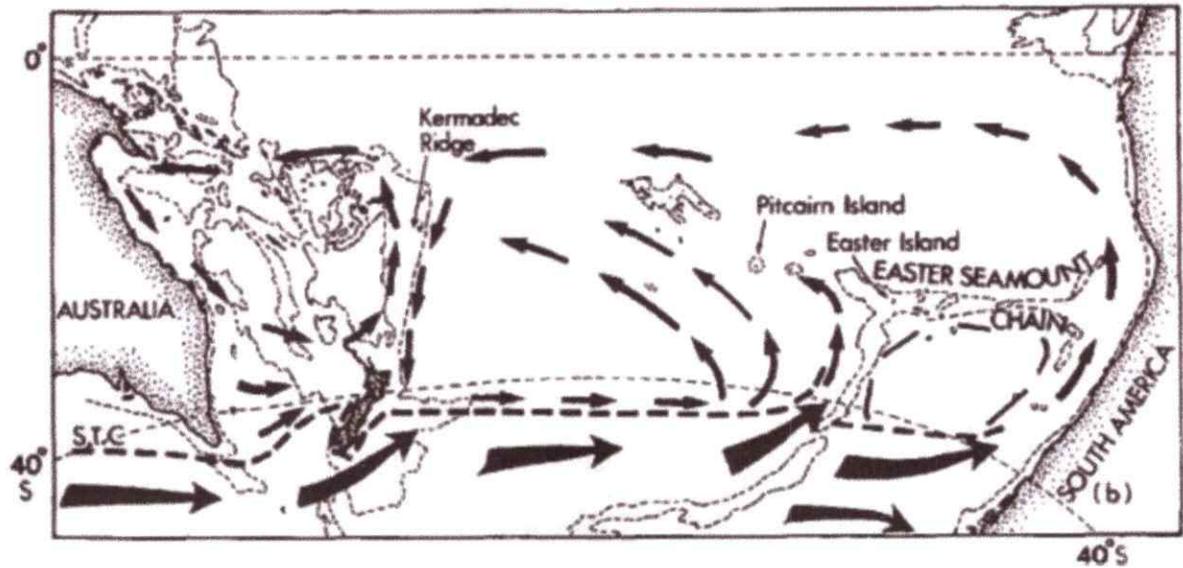


Figura 2. Patrones de circulación superficial en el océano Pacífico Sur, coincidente con la morfología del fondo marino, relacionada a la presencia de crestas y las cadenas de montes submarinos. Figura de Pollok (1992)

#### Objeto de estudio

El pez marino *Kyphosus sandwicensis* (Sauvage, 1880) más conocido como “Nanue”, es una especie de gran importancia económica y cultural en la IP, perteneciente a la familia Kyphosidae, grupo de peces de hábitos diurnos, con rasgos fisiológicos y morfológicos adecuados para el consumo de algas (Helfman *et al.*, 2009). En general, habitan arrecifes rocosos templados y tropicales de todo el mundo (Silvano & Güth, 2006) y específicamente *K. sandwicensis* se distribuye en el Pacífico central y occidental (exceptuando el trópico) (Randall & Cea, 2010), estando presente en la IP y SG. Individuos de esta especie pueden ser encontrados de forma solitaria o en grupos, pero también es posible encontrarlos junto a individuos de otras especies

como *K. vagiensis*, los adultos son encontrados en arrecifes hasta los 25m de profundidad (Knudsen & Clements, 2013). Como pez de arrecife, los primeros estadios de desarrollo, corresponden al principal periodo de dispersión, al respecto solo se conoce que los juveniles se asocian a restos flotantes o masas de algas, pudiendo ser encontrados en mar abierto. Knudsen & Clements (2016), sugieren que esta sería la probable explicación a la habilidad de las poblaciones de *kyphosus* para mantener la conectividad entre los océanos pacífico y atlántico.

*K. sandwicensis* es un importante recurso pesquero para los habitantes de la IP, quienes han ejercido la pesca por más de 800 años (Hunt & Lipo, 2006), se ha señalado que es la especie más capturada por los pescadores, al punto de tener 13 nombres diferentes, según color y tamaño (Randall & Cea, 2010). La pesca excesiva de esta especie, revela la gran importancia que tiene para los isleños como recurso alimenticio, sin embargo, su valor va más allá de su rol como un servicio ecosistémico. Porque, al ser una especie herbívora con una dieta casi exclusiva de macroalgas cafés, de géneros como *Sargassum*, *Dictyota* y *Lobophora* (Nemeth & Kadison, 2013; Randall & Cea, 2010), le otorga resiliencia a los ecosistemas de arrecifes de coral al regular el equilibrio entre corales y macroalgas (Lefèvre & Bellwood, 2011; Sakihara *et al.*, 2014; Welsh & Bellwood, 2014). Por lo tanto *K. sandwicensis* es indispensable en estos ecosistemas, los cuales están sometidos cada vez a mayores impactos antrópicos (Hughes *et al.*, 2003).

A pesar de la notoria importancia de *K. sandwicensis*, la información sobre su ecología en arrecifes de coral es relativamente escasa (Lefevre & Bellwood, 2011). Los datos de la historia de vida de *K. sandwicensis* son limitados y en particular no hay reportes relacionados a la biológica reproductiva (Silvano & Güth, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2011, Nemeth & Kadison, 2013), ni relacionados con los hábitos de movimiento de adultos y larvas. Los últimos estudios que se han

realizado del genero *Kyphosus*, es sobre la taxonomía donde han intentado aclarar las confusiones en torno a la validez de las especies.

#### **Estatus taxonómico de la especie en estudio**

En los últimos años se han instaurado dudas respecto a la validez de *Kyphosus sandwicensis* como especie, luego que Sakai & Nakabo (2004) indicaran que el espécimen tipo de esta especie no correspondiera a la descripción entregada por Sauvage (1880). De acuerdo a Knudsen & Clements (2013), Sauvage habría confundido los especímenes descritos enviados por Bailleu, cónsul francés de Hawai. Sakai & Nakabo (2004), inicialmente establecen que aquella descripción correspondería a *K. hawaiiensis* (Sakai & Nakabo, 2004). Luego de examinar el espécimen tipo, Knudsen & Clements (2013) concluyen que correspondería a un espécimen de *K. elegans* (Peter, 1869). Posteriormente, Sakai & Nakabo (2014) se suman a la idea que puede tratarse de *K. elegans*, sugiriendo asimismo que *Kyphosus sandwicensis* es sinónimo junior de *Kyphosus elegans*. Randall & Cea (2010), han estudiado a *K. sandwicensis*, pero, de acuerdo a Knudsen & Clements (2013), en Randall (2007) y Randall & Cea (2010) identificaron erróneamente a *K. sectatrix* (Linnaeus, 1758) como *K. sandwicensis*. Considerando estos antecedentes, taxonómicamente en IP estaría *K. elegans*, mientras que si consideramos las sugerencias de Knudsen & Clements (2013, 2016), las cuales han sido reafirmadas por Randall (conversación personal) estaríamos frente a *K. sectatrix*. Cabe destacar que todos estos estudios están fundamentados en análisis morfológicos, merísticos y análisis moleculares recientemente publicados, por lo tanto, surge la necesidad de focalizar investigaciones en esta área, para identificar la especie presente en IP y SG y así contribuir al conocimiento de su distribución.

En la presente tesis se estudió el flujo génico entre individuos de la especie *K. sandwicensis* proveniente de IP y SG. Mediante marcadores mitocondriales se detectó si existen señales de una historia filogeográfica y posteriormente utilizando microsatélites se calculó parámetros que permiten entender patrones de estructuración poblacional y conectividad entre IP y SG.

## HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El sistema de flujo y contraflujos junto a la corriente geostrófica de la zona, favorece la conectividad asimétrica entre las poblaciones de *k. sandwicensis* desde la IP hacia SG, generando históricamente un mayor flujo génico en esta dirección, y por lo tanto, una baja estructuración genética entre ambas islas.

## OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Determinar la estructuración genético poblacional y los patrones de flujo génico históricos de *Kyphosus sandwicensis* entre la isla de Pascua y la isla Salas y Gómez.

### *Objetivos específicos*

1. Identificación molecular de *K. sandwicensis* utilizando el gen Citocromo Oxidasa I.
2. Describir la historia filogeográfica de *K. sandwicensis* analizando la Región Control.
3. Establecer la variabilidad genética de *K. sandwicensis* en IP y SG.
4. Evaluar el nivel de estructuración de *K sandwicensis* en IP y SG.
5. Determinar la tasa y dirección del flujo génico histórico de *K. sandwicensis* en IP y SG.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Colección, identificación y extracción de ADN*

Se recolectaron 37 individuos de *Kyphosus sandwicensis* en la Isla de Pascua (IP: 27°07'S; 109°21'O) y 12 individuos en la Isla Salas y Gómez (SG: 26°28'S; 105°28'O), entre los años 2013 y 2015. A cada individuo se le tomo una pequeña muestra de aleta, las cuales fueron etiquetadas y transportadas al laboratorio en etanol, para posteriormente realizar la extracción de ADN y amplificación de microsatélites.

Para identificar molecularmente a los individuos de IP y SG a través del gen Citocromo Oxidasa I (COI), e inferir la historia filogeográfica analizando la Región Control, se realizó la extracción de ADN usando el protocolo de extracción salina (Aljanabi y Martinez 1997). La amplificación del gen COI se realizó utilizando las siguientes condiciones: 1x buffer, 3.2 nM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 U µL 1dNTP (Invitrogen), 5 pmol partidores directos e inversos, y 0.1 U µL<sup>-1</sup> polimerasa Taq (Invitrogen). La reacción de PCR (25 µL volumen final) incluyó una etapa de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 90 s, y a 72°C por 90 s, con una etapa final de elongación de 10 min a 72°C. Los partidores y condiciones de PCR para la amplificación siguieron el protocolo de Folmer *et al.*, (1994). Para la Región Control se utilizó los primers forward (5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGGAT-3') y reverse (5'-TGCGGATACTTGCATGTATAA-3') y el protocolo PCR con las condiciones de temperatura descritos por Veliz *et al.*, (2012). Los productos PCR

fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones en la empresa Macrogen Inc. (<http://www.macrogen.com>). Las secuencias fueron alineadas utilizando el software PROSEQ (Filatov 2002) y el alineamiento verificado con el software online MULTALIGN (Corpet, 1988).

#### *Análisis COI y Región control*

A partir de las secuencias alineadas de COI (N = 4 de cada isla), se construyó una matriz la cual además consideró todas las secuencias del género disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), con el fin de determinar si los individuos muestreados en IP coinciden genéticamente con los individuos muestreados en SG, así como para, dilucidar si estas secuencias corresponden genéticamente a una especie conocida o en última instancia determinar cuál es la especie más cercana. Se realizó un árbol usando el método Neighbor-Joining (NJ) implementado en el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

En el caso de la Región Control, la cual fue amplificada para la totalidad de las muestras, la matriz de secuencias alineadas sirvió de base para obtener características descriptivas de cada zona estudiada. Como índices de diversidad genética, se calculó la diversidad haplotípica (H), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la riqueza haplotípica (S) para cada isla y en su conjunto, además del número de pasos mutacionales y haplotipos compartidos mediante el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). Para determinar la existencia de una estructura filogeográfica significativa se evaluó si el  $G_{st}$  (coeficiente de variación genética a través de todas las poblaciones) es significativamente menor que el  $N_{st}$  (coeficiente equivalente teniendo en cuenta las similitudes entre los haplotipos), empleando 10.000 permutaciones a partir del software PerMut (Pons & Petit, 1996, Burban *et al.*, 1999). Con el fin de obtener una visión

cualitativa de las relaciones de cada secuencia asociada a un sitio, se construyó una red de haplotipos utilizando el método de Templeton TCS implementado en el programa PopArt 1.7 (Clement *et al.*, 2002).

#### *Amplificación de microsatélites.*

Para cuantificar la conectividad entre las islas, se amplificó un total de 16 microsatélites con las condiciones descritas por Vega-Retter & Véliz (2015). Los fragmentos resultantes fueron analizados inicialmente en geles de agarosa al 1.5% y posteriormente los productos de PCR fueron enviados al servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### *Análisis genéticos y estructuración poblacional*

A partir de los electroferogramas, se construyó una matriz de datos alélicos utilizando el programa GeneMarker (SoftGenetics Inc). Se identificaron posibles errores de genotipado, tales como corrimientos (stuttering) en el tamaño de bandas, amplificación predominante de alelos pequeños (dropout), así como la presencia de alelos nulos utilizando el software MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Con la tabla de valores alélicos de cada individuo se estimó el número de alelos por locus, frecuencia alélica, la heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), desequilibrio de ligamiento y desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg de cada loci mediante el programa GENETIX 4.0.5 (Belkhir *et al.*, 2000). Con el fin de evitar cometer errores Tipo I, se ajustó el valor de probabilidad obtenido para el Fis utilizando una corrección FDR (False Discovery Rate)

implementada en el programa R (R Core Team, 2015). Con el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995) se estimó la riqueza alélica (RA) y la diversidad genética (DG).

El análisis del grado de estructuración genética poblacional se realizó con tres tipos de aproximaciones. En primer lugar, se utilizó software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) el cual permite estimar el número probable de poblaciones o clusters dentro del universo de muestras. Este análisis utiliza una aproximación bayesiana donde maximiza el equilibrio H-W, buscando el número k de poblaciones que más se acerquen al equilibrio H-W. En segundo lugar, se estimó el índice  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham 1984) entre ambas islas con el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2000). La significancia estadística de este índice se realizó utilizando 10000 permutaciones e individuos entre los sitios estudiados. Finalmente, considerando que Meirmans y Hedricks (2011) aconsejan usar estadísticos alternativos en adición a  $F_{ST}$ , se utilizó el índice  $G''_{ST}$ , un estimador no influenciado por la heterocigosidad de las muestras y no sesgado cuando el número de poblaciones es bajo. Este índice se estimó con el software GenALEX 6.5 (Peakall y Smouse 2012) evaluándose su significancia con 9999 permutaciones.

Con el fin de determinar si *K. sandwichensis* ha sido sometido a un cuello de botella reciente, se realizó el análisis implementado en el software BOTTLENECK (Cornuet y Luikart, 1996), el cual permite realizar una estimación de la probabilidad de reducciones recientes en el tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) comparando la heterocigosidad esperada bajo HWE con la heterocigosidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva. Para este estudio se utilizó el modelo de mutación de dos fases con un 70% de mutación gradual; la significancia fue evaluada con la prueba de Wilcoxon implementada en el mismo software.

### *Estimación del flujo génico y migrantes efectivos.*

Para determinar los patrones de flujo génico de las poblaciones de *K. sandwicensis* entre IP y SG, se utilizó el software Migrate (Beerli & Felsenstein, 1999), el cual estima las tasas de flujo génico entre poblaciones, asumiendo un modelo matricial de migración con diferentes tamaños subpoblacionales y tasas de flujo génico asimétricas analizadas por las últimas  $4N_e$  generaciones. La tasa de migración histórica (MH) fue calculada a partir de  $MH = M\mu$ , donde  $M$  = tasa de flujo génico histórico escalado por la tasa de mutación y  $\mu$  = tasa de mutación. Por otro lado, el número de migrantes efectivos histórico (MEH), fue estimado usando la fórmula  $M \Theta/x$ , utilizando el promedio del valor más probable de  $\theta$  ( $\theta = xN_e \mu$ ). Donde  $N_e$ : tamaño efectivo poblacional,  $\mu$ : tasa de mutación y  $x$  es el parámetro de herencia y depende de la ploidía de los datos, por lo tanto, MEH fue obtenido al multiplicar el valor de  $N_e$  por MH. Para estos análisis se utilizó una tasa de mutación  $\mu = 2 \times 10^{-3}$  y  $x=4$  (para datos nucleares, valor estándar para microsatélites de peces).

## RESULTADOS

### *Análisis de COI*

Se logró secuenciar 580 bp sin indels y ambigüedades entre las secuencias. A partir de las 8 secuencias se obtuvo 7 haplotipos, con un nucleótido como máximo de diferencia y solo una secuencia se dejó fuera del análisis por presentar menor longitud. Al unir nuestros datos con aquellos obtenidos para el género en GenBank fue posible realizar una matriz de 29 haplotipos diferentes. Las secuencias alineadas mostraron que los individuos de IP y de SG comparten algunos haplotipos, por lo tanto, se puede inferir que corresponden a la misma especie. Por otro lado, utilizando 22 secuencias obtenidas desde Genbank, la estimación de las relaciones filogenéticas produjo 2 clados mayores bien sustentados, con altos valores de probabilidad del bootstrap (Fig. 3). *K. sandwicensis* de IP y SG se agrupó en un mismo clado junto a *K. bigibbus* (Sudáfrica: Walters Shoal) y *K. sectatrix* (Trinidad y Tobago) (Fig. 3), estando distanciadas genéticamente por solo una mutación (Fig. 4). Sin embargo, el análisis no es concluyente para definir cuál de estas es la especie más cercana.



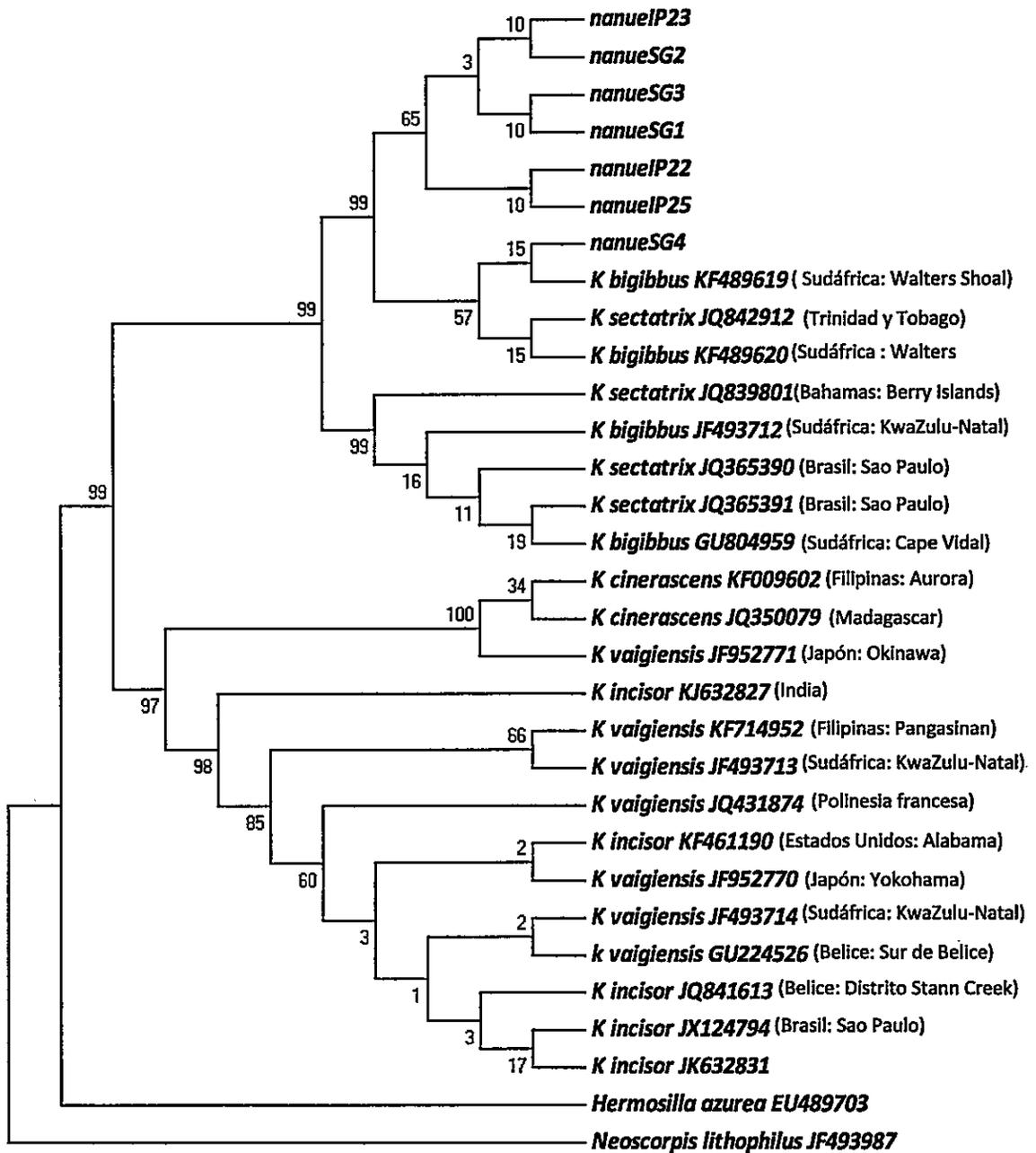


Figura 3. Ordenación genética entre las especies de *kyphosus* inferido desde el software Mega basado en ADN mitocondrial (COI). Los valores de nodos indican el valor de bootstrap. Las secuencias *Nanuel*P23, IP22, IP25 provienen de IP y las *nanue*SG1, SG2, SG3, SG4 provienen de SG. Las otras secuencias fueron obtenidas desde GenBank, se indica el número de acceso y la ubicación correspondiente.

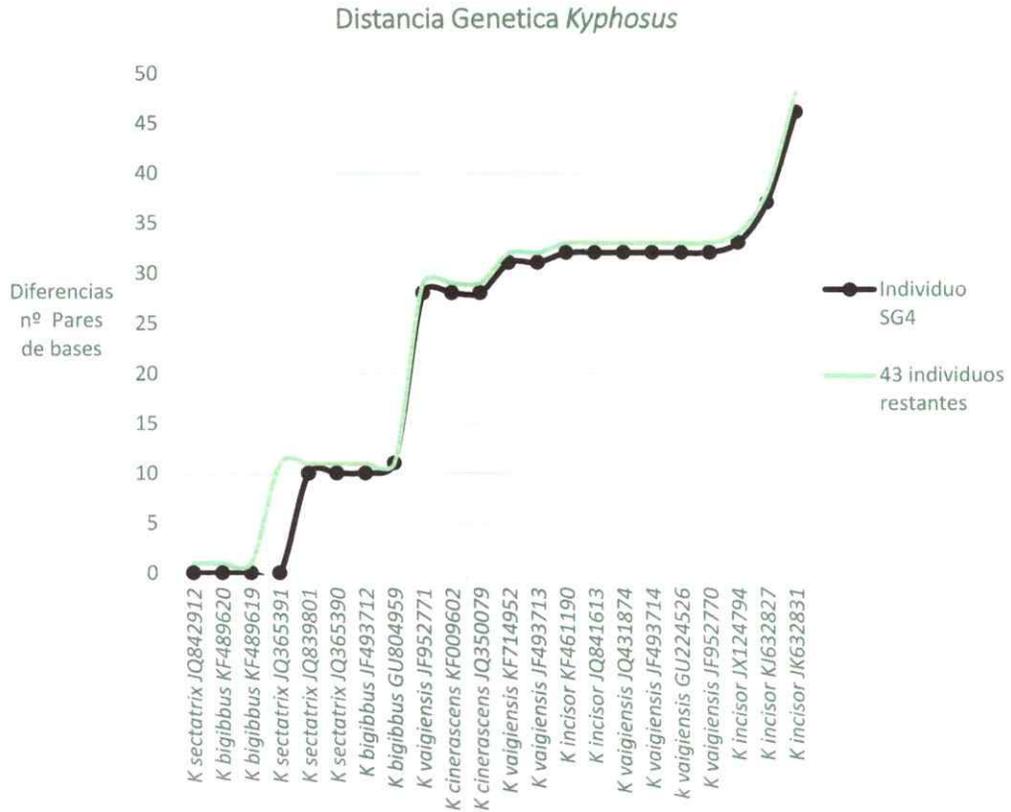


Figura 4. Distancia genética (diferencias en el número de pares de bases) entre los individuos de *Kyphosus* obtenidos desde GenBank (eje X) y los 44 individuos muestreados de IP y SG. SG4 corresponde al único individuo que mostro diferencias con los demás individuos muestreados, los 43 individuos restantes coinciden en la distancia genética.

#### *Análisis de Región Control*

Se logró secuenciar 936 bp sin indels y ambigüedades entre las secuencias. Se obtuvo un total de 37 haplotipos para las 44 secuencias realizadas, 5 muestras fueron apartadas de los análisis por mostrar secuencias muy divergentes, potencialmente se trata de otras especies muestreadas.

Las secuencias se ordenaron en una red de haplotipos que se muestra en la Fig. 5. En su mayoría los haplotipos se presentaron en un solo individuo. Se observó que 4 haplotipos fueron compartidos entre IP y SG (haplotipo 7, haplotipo 15, haplotipo 20 y haplotipo 30), sugiriendo así una relación entre las zonas estudiadas. En IP se encontró la mayor cantidad de haplotipos (31 secuencias únicas para IP), lo cual coincide con el mayor tamaño de muestras, en cambio, en SG solo 6 haplotipos son únicos, alelos privados que no se observaron en IP. De acuerdo a los niveles de variabilidad, *K. sandwicensis* muestra altos valores de diversidad haplotípica ( $H=0,992$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi =24,586$ ) y número de sitios polimórficos (163) (Tabla 1). Por un lado, IP presentó mayor número de sitios polimórficos, mientras que SG presentó mayor diversidad nucleotídica, y ambos presentaron similar diversidad haplotípica.

Los análisis de la Región Control mostraron que no existe una estructuración filogeográfica significativa. El valor de  $Nst$  (-0,019) no fue significativamente mayor que el valor de  $Gst$  (-0,015;  $P > 0.05$ ), indicando que no hay estructura filogeográfica significativa en la distribución de la especie entre IP y SG.

Tabla 1. Indicadores de variabilidad genética basadas en las secuencias de la región control. N: total individuos, S: número de sitios polimórficos, K: número de haplotipos, H: diversidad haplotípica,  $\Pi$ : diversidad nucleotídica.

	IP	SG	IP-SG
<b>N</b>	33	11	44
<b>S</b>	149	107	163
<b>K</b>	31	11	37
<b>H</b>	0,996	1	0,992
<b><math>\Pi</math></b>	23,341	29,055	24,586

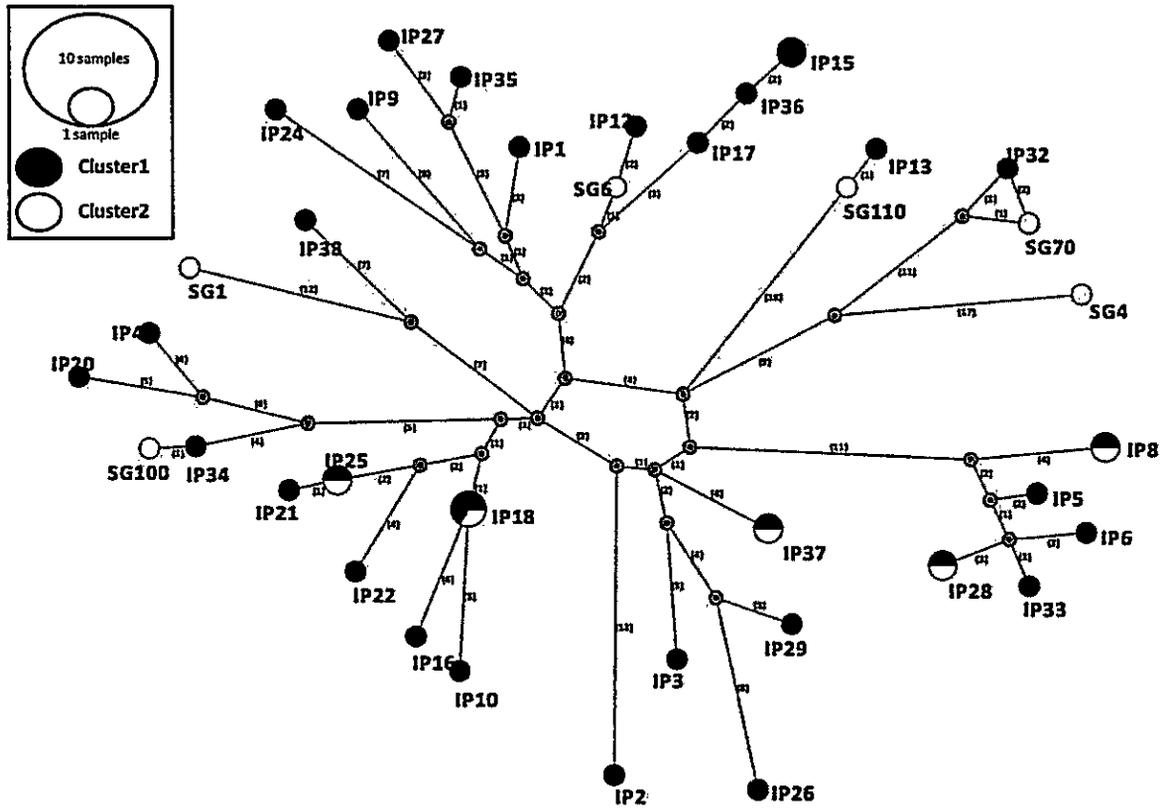


Figura 5. Red de haplotipos mediante el método de Templeton TCS para los 44 individuos de IP (Cluster1) y SG (Cluster2). Basada en secuencias de la Región Control (ADN mitocondrial). El tamaño de los haplotipos es proporcional a su frecuencia y los números entre haplotipos representan el número de pasos mutacionales.

*Análisis genético realizado con microsatélites*

Todos los locus resultaron ser polimórficos, la riqueza alélica promedio por locus varió desde 2,18 (N34) a 7,44 (N9) en IP y de 2,76 (N18) a 8,19 (N9) en SG. La heterocigosidad observada vario entre 0,1765 y 1, con un promedio de 0,697 y la  $H_E$  entre 0,2656 y 0,8875 promediando 0,7315 entre todos los locus y sitios de estudio (Tabla 2). No hubo diferencias cualitativas en

relación a la variabilidad genética de IP y SG, tanto la diversidad genética, como la riqueza alélica fueron similares (DG IP=0,735; SG=0,782 - RA IP=5,110; SG=5,608), mientras que el número total de alelos fue mayor en IP (Tabla 3). Además, no se observó evidencias de cuellos de botella recientes que pudiesen haber afectado la diversidad genética (SG  $p=0,58955$ ; IP  $p=0,08768$ ).

Tabla 2. Variables genéticas estimadas para cada loci. *n*: número de individuos, *Na*: número de alelos, *RA*: riqueza alélica, *DG*: Diversidad genética, *H<sub>o</sub>*: heterocigosidad observada, *H<sub>E</sub>*: heterocigosidad esperada, *F<sub>IS</sub>*: coeficiente de consanguinidad y su significancia estadística. *FDR*: valor de probabilidad corregido con el método FDR (corrección falsos positivos). \*  $P<0,05$  para desviaciones significativas de lo esperado para HWE.

Locus	Motivo repetitivo	Muestra	<i>n</i>	<i>Na</i>	<i>RA</i>	<i>DG</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>E</sub></i>	<i>F<sub>IS</sub></i>	<i>P</i>	<i>FDR</i>
Kyphosus2	(CA)20	IP	34	11	7,214	0,9	0,941	0,887	-0,046	0,319	0,421
		SG	12	11	7,620	0,902	0,916	0,864	-0,017	0,672	0,672
Kyphosus9	(TAGA)14	IP	34	13	7,444	0,901	0,848	0,886	0,058	0,219	0,421
		SG	12	12	8,189	0,92	0,833	0,878	0,095	0,26	0,421
Kyphosus12	(TAGA)13	IP	34	10	6,165	0,843	0,718	0,828	0,148	0,038*	0,172
		SG	12	8	6,154	0,822	0,7	0,775	0,149	0,245	0,421
Kyphosus13	(TG)18	IP	34	10	5,977	0,839	0,656	0,822	0,218	0,006*	0,105
		SG	12	6	6,000	0,783	0,5	0,694	0,362	0,071	0,263
Kyphosus18	(ACAG)9	IP	34	6	2,487	0,271	0,176	0,265	0,349	0,012*	0,106
		SG	12	4	2,761	0,311	0,25	0,295	0,195	0,262	0,421
Kyphosus24	(GT)20	IP	34	9	6,115	0,854	0,787	0,839	0,077	0,192	0,421
		SG	12	8	6,536	0,883	0,8	0,835	0,094	0,346	0,423
Kyphosus26	(TG)18	IP	34	12	6,769	0,868	0,906	0,855	-0,044	0,367	0,428
		SG	12	9	7,102	0,889	1	0,85	-0,125	0,318	0,421
Kyphosus33	(CAAT)11	IP	34	6	5,304	0,831	0,852	0,818	-0,027	0,474	0,522
		SG	12	6	4,712	0,761	0,916	0,736	-0,204	0,165	0,421
Kyphosus34	(ATAC)11	IP	34	3	2,180	0,427	0,451	0,420	-0,057	0,506	0,539
		SG	12	4	3,199	0,567	0,7	0,545	-0,235	0,287	0,421
Kyphosus38	(GT)12	IP	34	5	3,943	0,668	0,794	0,66	-0,189	0,041	0,172
		SG	12	5	4,400	0,765	0,916	0,739	-0,198	0,190	0,421

<i>Kyphosus39</i>	(AC)15	IP	34	11	5,211	0,778	0,531	0,762	0,317	0,001*	0,039*
		SG	12	8	6,127	0,848	0,75	0,809	0,116	0,271	0,421
<i>Kyphosus40</i>	(TG)13	IP	34	9	5,625	0,82	0,741	0,805	0,096	0,174	0,421
		SG	12	7	5,614	0,827	0,545	0,776	0,341	0,022*	0,150
<i>Kyphosus44</i>	(GT)11	IP	34	9	5,397	0,826	0,764	0,813	0,074	0,229	0,421
		SG	12	6	5,301	0,848	0,666	0,805	0,214	0,113	0,374
<i>Kyphosus45</i>	(TG)13	IP	34	4	3,476	0,587	0,545	0,577	0,070	0,331	0,421
		SG	12	6	5,234	0,836	0,545	0,785	0,348	0,028*	0,157
<i>Kyphosus51</i>	(AG)17	IP	34	6	3,728	0,594	0,588	0,585	0,010	0,547	0,564
		SG	12	7	5,168	0,75	0,833	0,722	-0,111	0,376	0,428
<i>Kyphosus54</i>	(TG)13	IP	34	7	4,720	0,748	0,689	0,733	0,077	0,282	0,421
		SG	12	7	5,618	0,799	0,444	0,734	0,443	0,009*	0,105

Tabla 3. Valores promedio para diversidad genética (DG), riqueza alélica (RA) y número de alelos totales para IP y SG (NAT).

	DG	RA	NAT
IP	0,7346875	5,1096875	131
SG	0,7819375	5,6084375	114

### *Microsatélites*

De los 16 microsatélites analizados, 8 loci presentaron desviaciones a lo esperado por Hardy-Weinberg (HWE) con  $p < 0.05$ , solo dos cuando se utiliza un  $p < 0.01$  y solo uno luego de la corrección FDR. Esto ocurrió siempre en solo uno de los dos sitios estudiados. Por otro lado, Microchecker sugirió que algunos loci podrían tener de alelos nulos. Sin embargo, en ambos casos esto no fue consistente para los dos sitios muestreados, por lo que las desviaciones al equilibrio HW y posible presencia de alelos nulos se deba principalmente al alto número de alelos observados. Por otro lado, no se observó desequilibrio de ligamiento, no obstante, en los datos alélicos 7 de las 240 posibles comparaciones locus-locus, presentaron desequilibrio al utilizar un  $\alpha = 0.05$ , pero ninguna de esas 7 comparaciones fue coincidente en las dos localidades.

### *Estructuración poblacional*

Los análisis de diferenciación poblacional indican que no existe evidencia de estructuración genética poblacional. Tanto los valores de  $\ln(K)$  obtenidos desde STRUCTURE que mostraron un máximo valor de likelihood en  $K=1$ , como los índices  $F_{ST}$  y  $G''_{ST}$  ( $F_{ST}=0,008$ ;  $p=0,089$  y  $G''_{ST}=0,030$ ;  $p=0,097$ ), sugieren la presencia de una sola población en estas dos islas.

### *Flujo génico y migrantes efectivos históricos.*

Los análisis de flujo génico histórica sugieren dispersión en ambas direcciones con un mayor aporte desde SG a IP, lo cual coincide con el mayor número de migrantes efectivos en SG (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de migración histórica (MH), migrantes efectivos históricos (MEH) entre IP y SG.

	<i>MH</i>	<i>MEH</i>
<i>IP a SG</i>	0,005	0,585
<i>SG a IP</i>	0,016	3,518

## DISCUSIÓN

Los resultados del estudio de la conectividad entre IP y SG, separadas por aprox. 415 km, evidenciaron una baja estructuración genética poblacional, sugiriendo la presencia de una sola población compuesta por individuos de IP y SG vinculados genéticamente. El flujo génico entre las islas se ha mantenido en el tiempo, gracias a la dispersión en ambas direcciones, siendo históricamente mayor desde SG a IP. Estos patrones de movimientos estarían determinados principalmente por las condiciones oceanográficas imperantes en la zona.

### *Correspondencia genética*

Los análisis del gen COI mostraron que las islas comparten haplotipos, por ende, se trataría de la misma especie. Si bien, en IP se ha registrado a *K. sandwicensis* por Randall (2007) y Randall & Cea (2010), autores como Knudsen & Clements (2013) y Sakai & Nakabo (2014) no lo consideran objetivo, debido a que en ese período Randall no conocía la controversia respecto a la identificación del espécimen tipo y que actualmente es considerado sinónimo junior de *K. elegans*. Adicionalmente, Knudsen & Clements (2013) señalaron que Randall confunde las especies, identificando erróneamente como *K. sandwicensis* a *K. sectatrix*, generando mayor duda entorno a la especie presente en IP. Debido a la ausencia de estudios genéticos que corroboren esta información, en este trabajo se buscó una correspondencia genética con alguna

especie conocida y aunque no se obtuvieron resultados concluyentes, determinamos que está relacionada con *K. sectatrix* y *K. bigibbus* (distanciados genéticamente por solo una base de nuestra especie en estudio), desconociendo su relación con *K. elegans* por la ausencia de información genética para este análisis.

Nuestros resultados son corroborados por el reciente estudio de Knudsen & Clements (2016), quienes han propuesto una hipótesis de relaciones filogenéticas para *Kyphosus*, evidenciando que *K. sectatrix* y *K. bigibbus* están estrechamente emparentadas (además de *K. hawaiiensis*, que no fue incluida en este estudio por no existir secuencias del gen COI para la especie). Por otro lado, con ello se podría descartar que la especie objetivo de este estudio presente en IP y SG, corresponda a *K. elegans*, ya que según los resultados de Knudsen & Clements (2016) estaría relacionada a *K. cinerascens*. Además, de acuerdo a los antecedentes *K. elegans* no se ha registrado en IP ni SG, pero si es común en mares tropicales del Océano Pacífico Este, desde el Golfo de California al sur a lo largo de la costa oeste del Pacífico de Panamá y ocasionalmente encontrada en islas Revillagigedo, Hawaii, isla Cocos e islas Galápagos (Knudsen & Clements 2013, Sakai & Nakabo 2014). En cambio, *K. sectatrix* y *K. bigibbus* si se han registrado en IP y SG. No obstante, debido a las semejanzas de estas especies (Randall 2007), registros de *K. bigibbus* han sido considerados erróneos. Knudsen & Clements (2013) sugieren que los registros de Pequeño (2004), Sakai & Nakabo (2004) en estas islas, probablemente sean incorrectos, correspondiendo a *K. sectatrix*.

La similitud morfológica del género ha llevado a nuevos estudios de taxonomía para revalidar las especies. En el caso de los análisis genéticos, las secuencias COI obtenidas en este estudio en conjunto con las secuencias obtenidas en GenBank no logran ser concluyentes, *K. sectatrix*, *K. Biggibus* y la especie presente en IP y SG muestran una alta similitud genética, encontrándose en

un mismo clado en el análisis NJ. Considerando esta información, creemos que se trata de la misma especie, sin embargo, se requieren más estudios. Las investigaciones futuras se deben concentrar en este punto para aclarar estas discrepancias de importancia a nivel mundial, considerando las implicaciones taxonómicas que subyacen.

### *Conectividad*

Los análisis genéticos mostraron que no existen evidencias de una estructuración genética y espacial en la especie *K. sandwicensis* distribuida en la IP y SG (índices  $F_{st}$  y  $G''_{st}$ ). Estos resultados fueron consistentes con el análisis realizado en el software STRUCTURE y con los análisis realizados con los marcadores mitocondriales, debido a que no se observaron evidencias de una historia filogeográfica entre las Islas. La red de haplotipos no mostró una marcada estructuración geográfica o segregación de los haplotipos y las islas compartieron algunos de ellos, lo cual corrobora una relación entre las islas, que al parecer es histórica. Además, esto se puede ver reflejado en la similitud genética evidenciada entre las islas, ya que tanto la diversidad genética como la riqueza alélica fueron similares. Aunque en la literatura hay carencia de estudios genéticos que respalden nuestros resultados, se ha observado una correspondencia ictiofaunística entre ellas, con un componente encontrado en SG, 100% representado en IP (Pequeño, 2004).

La conectividad histórica evidenciada entre la IP y SG distanciadas por 415km, constituye el primer registro de conectividad genética entre estas islas, siendo nuestros resultados concordantes con el paradigma instaurado en la conectividad de poblaciones marinas, el cual plantea que la aparente carencia de barreras oceanográficas permitiría mantener las poblaciones bien conectadas a través de grandes distancias por el estado larval (Cowen *et al.*,

2000). Otras especies que han mostrado conectividad a grandes distancias son por ejemplo, *kyphosus ocyurus* considerada verdaderamente transpacíficas, porque tiene la capacidad de atravesar la barrera del pacifico oriental y mantener conectadas las poblaciones. Este patrón se ha observado en otras 17 especies (Lessios & Robertson, 2006). Por ejemplo, *Epinephelus striatus* recorre 220km para desovar y formar agregaciones (Bolden, 1998). O como *K. Vaigiensis* que excepcionalmente ha registrado una dispersión de 311km a través de la isla Hawai, potencialmente buscando mejores condiciones ambientales o recursos alimenticios, donde la discontinuidad de hábitat o quiebres geográficos no fueron una limitante (Sakihara *et al.*, 2014). Aunque, el mecanismo dispersivo de estas especies es especie-especifico, en peces de arrecifes que son relativamente sedentarios como adultos, se ha observado mayor dispersión durante el estado larval pelágico favorecido por las corrientes oceánicas.

#### *Factores explicando el patrón observado*

Respecto al patrón de dispersión entre IP y SG, la dirección de la conectividad resulto ser contraria a la predicción inicialmente planteada, que consideraba una dispersión asimétrica desde IP a SG. Esta diferencia radica en que los pocos estudios de la zona son de corta duración y el patrón sugerido es basado en los valores promedios de la corriente geostrofica, asociado a un sistema de flujos y contraflujos que sugieren un flujo hacia el este (Pollock 1992; Rivera y Mujica 2004; Tapia 2010, Testa 2014). En este punto es importante indicar que nuestros resultados corresponden a un patrón histórico del flujo génico, un promedio de las últimas 4Ne generaciones, por lo que probablemente abarca una mayor cantidad de factores influenciando las condiciones oceanográficas, y por ende la dirección de las corrientes marinas.

En este sentido, se sugieren diversos factores que pueden estar generando variabilidad en la direccionalidad de las corrientes oceánicas:

i) Gaines *et al.*, (2007) indica que las discontinuidades oceanográficas, pueden alterar el carácter direccional e intensidad de la mezcla de aguas transportando larvas de poblaciones adyacentes, como la presencia de montes submarinos que generan complejos patrones de corrientes oceánicas y a menudo generando surgencias en aguas circundantes.

ii) IP por su ubicación en el centro del giro anticiclónico del pacífico sur, se vería afectada por la variabilidad estacional e interanual de factores climáticos-oceanográficos como el Niño y la Oscilación del sur (ENSO), por lo tanto, la producción biológica y la exportación de organismos respondería a esta variabilidad climática (Andrade *et al.*, 2014).

iii) Los remolinos a mesoescala han sido reportados como importantes actores en el transporte de organismos y nutrientes entre zonas alejadas, los cuales generarían períodos de intensas corrientes en dirección contraria (Correa-Ramírez *et al.*, 2007), arrastrando y reteniendo las larvas y recursos alimenticios hasta por 65 días (Lobel, 1988).

iv) El viento también puede ser determinante, ya que se considera que influye significativamente en la generación de remolinos mesoescala, situación que también puede darse en IP. Todos estos antecedentes, sumado a la alta variabilidad de corrientes observadas en IP (Yañez *et al.*, 2014), podrían explicar el movimiento de organismos en ambas direcciones.

Considerando que los patrones de circulación oceánica pueden jugar un rol especialmente relevante en configurar patrones de distribución (Gaines *et al.*, 2007; Cowen *et al.*, 2000, 2006; Aiken *et al.*, 2007), utilizamos una modelación preliminar (realizada por la Dra. Erika Meerhoof) de movimiento de partículas inertes acoplados a modelos oceanográficos. Se realizaron tres

modelamientos de partículas liberadas en abril (periodo que se estima con presencia de larvas de la especie), a diferentes rangos de profundidad (1°:0-50m; 2°:50-200m; 3°:200-500m), para los años 2000, 2002 y 2006 y bajo distintas condiciones oceanográficas (el niño y la niña por ejemplo). Estos análisis sugieren una situación en la cual es posible que exista una conectividad como la propuesta por los datos genéticos: esto resulta cuando las larvas viajan a una profundidad de 50 a 200m, por 150 días desde la liberación en IP y SG.

Sin embargo, la información genética y la modelación oceanográfica propuesta aun necesitan mayor información. Por ejemplo, no tenemos información de los primeros estados de desarrollo de *K. sandwicensis*. La información obtenida de otras especies indica que las larvas de *Kyphosidos* pueden recorrer grandes distancias asociado a restos flotantes (Rafting). Al respecto, Luiz *et al.*, (2015) establecen que estos restos flotantes puede actuar como hábitat sustituto, refugio y criadero para juveniles, proporcionando un medio para la dispersión a través de grandes tramos de mar abierto. Además, ellos han asociado positivamente rasgos ecológicos de peces de arrecifes con el rafting, como por ejemplo, formación de agregaciones y posición en la columna de agua sobre el sustrato de arrecife, que indica dependencia al sustrato.

En este sentido, las características expuestas son típicas en los *kyphosidos*, ya que algunas especies dispersan a altamar y forman agregaciones de desove de más de 150 individuos como es el caso de *K. sectatrix* (Nemeth & Kadison 2013). Además, la mayoría son herbívoros asociados a arrecifes y se han observado juveniles de *K. incisor* y *K. sectatrix* bajo tapetes de algas *Sargassum* (Moore 1962), el principal recurso alimenticio de *K. sandwicensis* (Knudsen & Clements 2013) y considerada uno de los más comunes flotadores empleados para el rafting (Luiz *et al.*, 2015). Destacando en última instancia, es probable que en este proceso también participe la basura plástica flotante, la cual puede albergar una comunidad incrustada, con lo

que las larvas y juveniles pueden alimentarse (Luiz *et al.*, 2016), hecho que ha sido observado en el giro del pacifico sur a los 27°S 99°W (Thiel datos sin publicar y actualmente trabajando en la identificación de la comunidad asociada).

Esta estrategia podría ser la responsable de la gran dispersión que experimentan varias especies de kyphosidos, como *K. bigibbus*, *K. septratix*, *K. cinerascens* y *K. vaigiensis* las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en los océanos de todo el mundo (e.g. Luiz *et al.*, 2015, Knudsen & clements 2016). Por lo tanto, factores oceanográficos que pueden mover larvas entre las islas y el posible rafting podrían explicar el patrón de conectividad observado en *k. sandwicensis*, lo cual permite comprender como una población compuesta por individuos distanciados por 415km, puede mantener la conectividad genética.

## CONCLUSIONES

La Isla de Pascua y la isla Salas y Gómez están distanciadas por 415km de mar abierto con grandes profundidades, no obstante *kyphosus sandwicensis* ha mantenido una conectividad histórica bidireccional, siendo predominante desde SG a IP. Esto nos demuestra que el ambiente oceanográfico no ha sido una limitante para su dispersión, por el contrario, facilitaría la advección de larvas y juveniles contribuyendo con el movimiento de propágulos para mantener el flujo génico entre las islas y mantener conectada esta población. Por lo tanto, la dispersión larval a través de rafting sería una de las explicaciones para la conexión encontrada en *K. sandwicensis* entre IP y SG.

Esta evidencia constituye el primer registro de conectividad genética entre estas islas y genera un nuevo punto de vista de la dinámica poblacional en la zona, información importante para el diseño e implementación de reservas marinas. Es relevante indicar que en SG se sitúa la reserva marina más grande de América del Sur, con una mayor biomasa ictiofaunística y endemismo, mientras que en IP existen pocas medidas de protección. Si consideramos, los intensos periodos de pesca que se ejercen sobre *k. sandwicensis* y otras especies de importancia comercial en IP, la dispersión evidenciada en esta tesis puede ser considerada en nuevas estrategias de conservación que permitan resguardar la diversidad genética de aquellas especies de importancia para la conservación o de importancia comercial. En el caso de *kyphosus*

*sandwicensis* en SG se observó la presencia de alelos privados, exclusivos de este sector y dado el flujo génico evidenciado, en el futuro pueden ser exportados a IP, favoreciendo la variabilidad genética.

Finalmente, se destaca el vacío en el conocimiento de algunos aspectos fundamentales para comprender la dinámica poblacional. Si bien, observamos una correspondencia genética, siendo la misma especie presente en IP y SG, nuestros resultados no fueron concluyentes debido a la falta de información de algunas especies, además de las numerosas confusiones en su identificación y descripción biológica, lo cual genera incertidumbre en aspectos básicos como el periodo reproductivo, la duración del periodo larval, etc. Por lo tanto, es necesario desarrollar más investigaciones en este grupo de peces.

## BIBLIOGRAFIA

- Aiken, C.M. y col. 2007. Along-shore larval dispersal kernels in a numerical ocean model of the central Chilean coast. *Mar Ecol Prog Ser.* 339: 13-24.
- Aljanabi, S.M. Y Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Andrade, I. y col. 2014. Time-space variability of satellite chlorophyll-a in the Easter Island Province, southeastern Pacific Ocean/Variabilidad espacio-temporal de la clorofila-a satelital en la Provincia de Isla de Pascua, Océano Pacífico suroriental. *Lajar.* 42(4): 871.
- Bay, L.K. y col. 2008. Meta-population structure in a coral reef fish demonstrated by genetic data on patterns of migration, extinction and re-colonisation. *BMC Evol. Biol.* 8(1): 248.
- Bell, J.J. 2008. Connectivity between island Marine Protected Areas and the mainland. *Conserv Biol.* 141(11): 2807-2820.
- Beerli, P. Y Felsenstein, J. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics.* 152: 763-773.
- Belkhir, K. y col. 2000. GENETIX version 4.02. Logiciel sous WindowsMT pour la Génétique des Populations. Laboratoire Ge 'nome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France (in French).
- Bernardi, G. 2000. Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. *Evolution.* 54(1): 226-237.
- Bolden, S.K. 1998. Long-distance movement of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) to a spawning aggregation in the central Bahamas. *Fish Bull.* 98: 642-645.
- Burban, C. y col. 1999. Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc.(Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Mol ecol.* 8(10): 1593-1602.
- Broquet, T. y col. 2013. Genetic drift and collective dispersal can result in chaotic genetic patchiness. *Evolution* 67: 1660-1675.
- Christie, M.R. y col. 2010. Larval connectivity in an effective network of marine protected areas. *PloS one.* 5(12): e15715.

- Clement, M. y col. 2002. TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*. 2: 184.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignments with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890.
- Cornuet, J.M. Y Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144: 2001-2014.
- Correa-Ramírez, M. y col. 2007. Mesoscale eddies and high chlorophyll concentrations off central Chile (29°-39°S). *Geophys. Res. Lett.* 34(12): 1-5.
- Cowen, R.K. y col. 2000. Connectivity of marine populations: open or closed? *Science*. 287(5454): 857-859.
- Cowen, R.K. y col. 2006. Scaling of connectivity in marine populations. *Science*. 311(5760): 522-527.
- Cowen, R.K. y col. 2007. Population connectivity in marine systems An Overview. *Oceanography*. 20 (3):14-21.
- Cowen, R.K. Y Sponaugle, S. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1: 443-466.
- De Oliveira, M.E. y col. 2005. Genetic variation and population structure of two species of neo-tropical mud-mussels (*Mytella* sp.). *Genet Mol Res*. 4: 197-202.
- Filatov, D.A. 2002. ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol Ecol Notes*. 2: 621-624.
- Folmer, S.C. y col. 1994. DNA primers for amplification for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 3: 294-299.
- Frankham, R. 1995. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conserv Biol*. 9: 792-799.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv Biol*. 10(6): 1500-1508.
- Friedlander, A.M. y col. 2013. Effects of isolation and fishing on the marine ecosystems of Easter Island and Salas y Gómez, Chile. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*. 23(4): 515-531.
- Gaines, S.D. y col. 2007. Connecting places. The ecological consequences of dispersalin the sea *Oceanography*. 20: 90-99.
- Goudet, J.1995. FSTAT (version 1.2) – a computer program to calculate F-statistics. *J Hered*. 86: 485-486.
- Hauser, L. y col. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *PNAS*. 99(18): 11742-11747.

- Hedgecock, D. y col. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography*. 20(3): 70.
- Hellberg, M.E. 2007. Footprints on water: the genetic wake of dispersal among reefs. *Coral Reefs*. 26: 463-473.
- Helfman, G. y col. 2009. *The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology*. John Wiley & Sons. 56pp.
- Hixon, M.A. y col. 2002. Population regulation: historical context and contemporary challenges of open vs. closed systems. *Ecology*. 83: 1490-1508.
- Hughes, T.P. y col. 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science*. 301(5635): 929-933.
- Hunt, T.L. Y Lipo, C.P. 2006. Late colonization of Easter Island. *Science*. 311: 1603-1606.
- Hutchings, J.A. Y Reynolds, J.D. 2004. Marine fish population collapses: consequences for recovery and extinction risk. *BioScience*. 54(4): 297-309.
- Jones, G.P. y col. 2007. Population connectivity and conservation of marine biodiversity. *Oceanography*. 20: 100-111.
- Jones, G.P. y col. 2009. Larval retention and connectivity among populations of corals and reef fishes: history, advances and challenges. *Coral Reefs*. 28(2): 307-325.
- Kinlan, B.P. Y Gaines, S.D. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*. 84: 2007-2020.
- Knudsen, S.W. Y Clements, K.D. 2013. Revision of the fish family Kyphosidae (Teleostei: Perciformes). *Zootaxa*. 3751: 1-101.
- Knudsen, S.W. Y Clements, K.D. 2016. World-wide species distributions in the family Kyphosidae (Teleostei: Perciformes). *Mol Phylogenet Evol*. 101: 252-266.
- Lefèvre, C.D. Y Bellwood D.R. 2011. Temporal variation in coral reef ecosystem processes: Herbivory of macroalgae by fishes. *Mar Ecol Prog Ser*. 422: 239-251.
- Lessios, H.A. Y Robertson, D.R. 2006. Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proc R Soc Lond [Biol]*. 273(1598): 2201-2208.
- Lewin, W.C. y col. 2006. Documented and potential biological impacts of recreational fishing: insights for management and conservation. *Rev Fish Sci*. 14(4): 305-367.
- Librado, P. Y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae Sive Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, Cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*, 10th ed., Laurentii Salvii, Holmiae, pp. 1-824.
- Lobel, P.S. Y Robinson, A.R. 1988. Larval fishes and zooplankton in a cyclonic eddy in Hawaiian waters. *J Plankton Res*. 10(6): 1209-1223.

- Luiz, O.J. y col. 2015. Seafarers or castaways: ecological traits associated with rafting dispersal in tropical reef fishes. *J Biogeography*. 42(12): 2323-2333.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard, Belknap Press, Cambridge, MA. 30pp.
- Meirmans, P.Y Hedricks, P.W. 2011 Assessing population structure: FST and related measures. *Mol Ecol Resur*. 11: 5-18.
- Nemeth, R.S. Y Kadison, E. 2013. Temporal patterns and behavioral characteristics of aggregation formation and spawning in the Bermuda chub (*Kyphosus sectatrix*). *Coral Reefs*. 32(4): 1067-1076.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annu Rev Ecol Sys*. 25: 547-572.
- Palumbi, S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol Appl*. 13(1): 146-158.
- Peakall, R. Y Smouse, P.E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Pequeño, G. 2004. Peces litorales de la isla Salas y Gómez, Chile, capturados durante el crucero Cimar-Islas, en 1999. *Cienc Tecnol Mar*. 27(1): 95-101.
- Peters, W.C. 1869. Über neue oder weniger bekannte Fische des Berliner Zoologischen Museums. *Monatsberichte der Akademie der Wissenschaft zu Berlin*. 1869: 703-711.
- Pollock, D. 1992. Paleocenography and speciation in the spiny lobster genus *Panulirus* in the IndoPacific. *Bull. Mar. Sci*. 51(2): 135-146.
- Pons, O. Y Petit, R.J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144(3): 1237-1245.
- Planes, S. y col. 2009. Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(14): 5693-5697.
- Pritchard, J.K. y col. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 115: 945- 959.
- R Core Team (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Randall, J.E. 2007. *Reef and Shore Fishes of the South Pacific*. University of Hawai'i Press, Honolulu. xii + 707 pp.
- Randall, J.E. Y Cea, A. 2010. *Shore Fishes of Easter Island*. University of Hawaii Press. 53pp.
- Rivera, J. Y Mujica, A. 2004. Larvas phyllosoma (Decapoda, Palinuridae y Scyllaridae) de las islas oceánicas chilenas. *Rev Investig Mar*. 32(2): 99-111.
- Roberts, C.M. y col. 2002. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*. 295: 1280-1284.

- Romero, M. Y Acosta, A. 2012. Conocimiento Científico Permeando la Política Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Conservación internacional Colombia Bogota.150pp
- Rovira, J. y col. 2008. Capítulo IV: El hombre y la biodiversidad, áreas protegidas en Chile, en: Saball, A. 2006. Biodiversidad de Chile: patrimonio y desafíos. 512-560.
- Sakai, K.Y Nakabo, T. 2004. Two new species of *Kyphosus* (Kyphosidae) and a taxonomic review of *Kyphosus bigibbus* Lacepede from the Indo-Pacific. *Ichthyol Res.* 51: 20-32.
- Sakai, K. Y Nakabo, T. 2014. Taxonomic review of *Kyphosus* (Pisces: Kyphosidae) in the Atlantic and Eastern Pacific Oceans. *Ichthyol Res*, 61(3): 265-292.
- Sakihara, T.S. y col. 2014. Brassy chubs *Kyphosus vaigiensis* display unexpected trans-island movement along inshore habitats. *Environ Biol Fishes.* 1-9.
- Sauvage, H.E. 1880. Description de quelques poissons de la collection du Muséum d'histoire naturelle. *Bulletin de la Société philomathique de Paris (7th Série).* 4: 220-228.
- Silvano, R.A. Y Güth, A.Z. 2006. Diet and feeding behavior of *Kyphosus* spp. (Kyphosidae) in a Brazilian subtropical reef. *Braz Arch Biol Techn.* 49(4): 623-629.
- Tamura, K. y col. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tapia, C.J. Y Marino, B. 2010. Informe Langosta de Isla de Pascua (*Panulirus pascuensis* Reed, 1954). 31pp
- Testa, G. 2014. Variabilidad espacio-temporal de clorofila-a superficial e influencia de los montes submarinos en la Eastern Seamount. Universidad Católica de Valencia, San Vicente Mártir. 51pp.
- Van Oosterhout, C. y col. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes.* 4: 535-538.
- Van Straalen, N.M. Y Timmermans, M.J. 2002. Genetic variation in toxicant stressed populations: an evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Hum Ecol Risk Assess.* 8: 983-1002.
- Weersing, K. Y Toonen, R.J. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Mar Ecol Prog Ser.* 393(1): 12. Weir, B.S. Y Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38: 1358-1370.
- Vega-Retter, C. Y Véliz, D. 2015. Isolation and characterization of sixteen microsatellite loci for the rudderfish *Kyphosus elegans* (Centrarchiformes: Kyphosidae) from Easter Island, discovered with Next Generation Sequencing. *J Appl Ichthyol.* 31: 915-916.
- Veliz, D. y col. 2012. The genus *Basilichthys* (Teleostei: Atherinopsidae) revisited along its Chilean distribution range (21° to 40° S) using variation in morphology and mtDNA. *Rev Chil Hist Nat* 85(1): 49-59.
- Welsh, J.Q. Y Bellwood, D.R. 2014. Herbivorous fishes, ecosystem function and mobile links on coral reefs. *Coral Reefs.* 33(2): 303-311.

Yamaguchi, A. y col. 2011. Spawning season and size at sexual maturity of *Kyphosus bigibbus* (Kyphosidae) from northwest Kyushu, Japan. *Ichthyol Res.* 58(3): 283-287.

Yáñez, E. y col. 2014. Socio-ecological analysis of the artisanal fishing system on Easter Island/Análisis socio-ecológico del sistema pesquero artesanal de Isla de Pascua. *Lajar.* 42(4): 803-813.

Zylich, K. y col. 2014. Fishing in Easter Island, a recent history (1950-2010)/La pesca en Isla de Pascua, una historia reciente (1950-2010). *Lat Am J Aquat Res.* 42(4): 845-856.